

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto
clorofórmico de las hojas de Chuquiraga lessing
“Huamanpinta”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Mg. Emilio Germán Ramírez Roca

ASESOR

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Lima – Perú

2014

A Dios, por todo lo que me ha dado

A mis hijos, por su amor y comprensión

A mi padre y a la memoria de mi madre

A mis hermanos, por su aliento permanente.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, por su excelente asesoría y dedicación

Al Dr. Jorge Arroyo Acevedo, por su apoyo y colaboración

A la Dra. Silvia Suárez Cunza, por su apoyo y colaboración.

A los colegas del Instituto de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM: Dr. Américo Castro Luna, Fritz Choquesillo Peña, Miguel Félix Veliz, por su apoyo y colaboración.

Al jurado informante de la tesis:

Dr. Víctor Crispín Pérez (Presidente)

Dr. Pablo Bonilla Rivera (Asesor)

Dr. Jorge Arroyo Acevedo (Miembro)

Al jurado Examinador y Calificador:

Dra. María Elizabeth Gonzales Loayza (Presidenta)

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Miembro-Asesor)

Dr. Américo Jorge Castro Luna (Miembro)

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Miembro)

Dr. Víctor Crispín Pérez (Miembro)

A todos ellos por sus valiosas contribuciones y consejos

LISTA DE ABREVIATURAS

NK = Células asesinas naturales

UV = Ultra violeta

TPA = 12-O-tetradecanoilforbol-13 Acetato

MIC = Concentración mínima inhibitoria

EBH = Extracto bruto hidroalcohólico

PDGF = Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

TGF- β = Factor β de crecimiento tumoral

FGF = Factor de crecimiento de fibroblasto

ERO = Especies reactivas del oxígeno

ERN = Especies reactivas del nitrógeno

TNF- α = Factor α de necrosis tumoral

IL = Interleukina

DNA = Acido desoxiribonucleico

NF κ B = Factor de transcripción nuclear kappa B

iNOS = Enzima óxido nítrico sintasa inducida

NO = Óxido nítrico

AINE = Analgésico antiinflamatorio no esteroideo

AIE = Antiinflamatorio esteroideo

COX = Ciclooxygenasa

PG = Prostaglandina

TX = Tromboxano

SOD = Enzima Superóxido dismutasa

CAT = Enzima catalasa

GSH-PX = Glutation peroxidasa

G6PDH = Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

EM = Enzima málico

SIRT = Proteínas denominadas sirtuinas

NAD⁺ = Nicotin adenin dinucleotido oxidado

ATP = Adenosin trifosfato

Ig = Inmunoglobulina

PUM = Proteína de unión a manosa

MHC = Complejo principal de histocompatibilidad

INF-γ = Interferón gamma

PBMC = Células mononucleares de sangre periférica

DL₅₀ = Dosis letal 50

OECD = Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo.

INS = Instituto Nacional de Salud

DPP = 1,1-Difenil-2-picril hidrazilo

MDA = Malondialdehído

EDTA = Ácido etilendiaminotetracético

UI = Unidades internacionales

CMC = Carboximetilcelulosa

ANOVA = Análisis de varianza

TEAC = Concentración antioxidante equivalente al trolox

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo de solubilidad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 3. Peso promedio de ratones balb/c al evaluar la toxicidad aguda del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 4. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 5. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (UI SOD/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 6. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Malondialdehído (umoles/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 7. Diámetro promedio de inflamación de la pata trasera al evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 8. ANOVA y significancia de la curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación vs tiempo de tratamiento con el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 9. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 10. ANOVA y Dunnett del promedio de los valores de Malondialdehído (MDA) en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 11. ANOVA y Dunnett del promedio de los valores de proteínas totales en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 12. ANOVA y Dunnett del promedio de los valores de albumina en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 13. Captación de la tinta china y porcentaje de activación de la respuesta inmunomoduladora del extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 14. ANOVA y Scheffe de la eficiencia de la actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* frente al Isoprinosine y prednisona.

Tabla 15. Acción sobre la formula leucocitaria del extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, vs los estándares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”

Figura 2. Etapas de la inflamación.

Figura 3. Mecanismo de acción de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos.

Figura 4. Mecanismos de formación y eliminación de ROS y otros radicales libres dentro de la célula.

Figura 5. Inmunidad innata y adaptativa.

Figura 6. Clases de linfocitos. Reconocimiento del antígeno y funciones efectoras.

Figura 7. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción 2 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Figura 8. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción 3 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Figura 9. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción 7 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Figura 10. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción 8 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Figura 11. Estudio histopatológico de la piel de ratas al evaluar la actividad antiinflamatoria en procesos crónicos por inducción de granuloma con carragenina, ibuprofeno, prednisona y los extractos a 100, 200 y 300 mg/kg de peso.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Peso promedio de ratones balb/c al evaluar la toxicidad aguda del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 2. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 3. Promedio de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 4. Promedio de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (UI SOD/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 5. Promedio de niveles sanguíneos de Malondialdehído (umoles/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 6. Curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación vs tiempo de tratamiento con el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 7. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Gráfico 8. Promedio de los valores de Malondialdehído (MDA) en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Gráfico 9. Promedio de los valores de proteínas totales en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Gráfico 10. Promedio de los valores de albumina en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Gráfico 11. Eficiencia de la actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* frente al Isoprinosine y prednisona.

ÍNDICE

RESUMEN.....

SUMMARY.....

RESUMO.....

I. INTRODUCCIÓN.....

- 1.1. Situación problemática.....
- 1.2. Formulación del problema.....
 - 1.2.1. Problema general.....
 - 1.2.2. Problemas específicos.....
- 1.3. Justificación teórica.....
- 1.4. Justificación práctica.....
- 1.5. Objetivos.....
 - 1.5.1. Objetivo general.....
 - 1.5.2. Objetivos específicos.....

II. MARCO TEÓRICO.....

- 2.1. Antecedentes de la investigación.....
- 2.2. Bases teóricas.....
 - 2.2.1. *Chuquiraga lessing*.....
 - 2.2.2. Clasificación Sistemática de la Especie.....
 - 2.2.3. Distribución Geográfica y Hábitat.....
 - 2.2.4. Composición química y usos tradicionales.....
 - 2.2.5. La inflamación.....
 - 2.2.5.1. Mecanismos de la inflamación.....
 - 2.2.5.2. Inflamación aguda y subaguda tardía.....
 - 2.2.5.3. Inflamación crónica.....
 - 2.2.6. Rol de las especies reactivas en la inflamación.....
 - 2.2.7. Fármacos antiinflamatorios.....
 - 2.2.7.1. Fármacos antiinflamatorios esteroides o Corticoesteroides.....
 - 2.2.7.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)...
 - 2.2.8. Radicales libres.....
 - 2.2.8.1. Biomecanismos de formación de radicales libres.....
 - 2.2.8.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN).....
 - 2.2.9. Antioxidantes.....
 - 2.2.9.1. Enzimas antioxidantes.....
 - 2.2.9.2. Superóxido dismutasa.....
 - 2.2.9.3. Catalasa.....
 - 2.2.10. El sistema inmunológico.....
 - 2.2.10.1.- Inmunidad innata.....
 - 2.2.10.2. Barreras epiteliales.....
 - 2.2.10.3. Células efectoras.....
 - 2.2.10.4. Proteínas efectoras.....
 - 2.2.11. Inmunidad adaptativa.....
 - 2.2.12.- Inmunomodulación.....
- 2.3. Marco conceptual.....
- 2.4. Formulación de la Hipótesis y variables.....
 - 2.4.1. Hipótesis.....
 - 2.4.2. Variables.....

III. METODOLOGÍA.....

- 3.1. Tipo de estudio.....

3.2. Muestra.....	
3.2.1. Identificación.....	
3.2.2. Colecta de la especie.....	
3.3. Conservación de animales de laboratorio.....	
3.4. Procedimiento.....	
3.4.1. Obtención del Extracto Clorofórmico.....	
3.4.2. Estudios químicos.....	
3.4.2.1. Determinación de la prueba de solubilidad.....	
3.4.2.2. Marcha fitoquímica.....	
3.4.2.3. Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico total.....	
3.4.2.4. Cromatografía en capa fina a escala preparativa.....	
3.4.2.5. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV.....	
3.5. Ensayos Biológicos.....	
3.5.1. Toxicidad aguda oral.....	
3.5.2. Actividad antioxidante <i>in Vitro</i>	
3.5.3. Actividad antioxidante <i>in Vivo</i>	
3.5.3.1. Determinación de la Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD).....	
3.5.3.2. Determinación de la Actividad de la Catalasa (CAT).....	
3.5.3.3. Determinación de la Actividad del Malondialdehído (MDA).....	
3.6. Actividad antiinflamatoria.....	
3.7. Actividad Antiinflamatoria en procesos crónicos.....	
3.8. Actividad Inmunomoduladora.....	
IV. RESULTADOS.....	
4.1.- Resultados del estudio químico.....	
4.2. Resultados del estudio de toxicidad aguda a dosis única.....	
4.4. Resultados del estudio de la actividad antioxidante.....	
4.4.1. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	
4.4.2. Actividad antioxidante <i>in vivo</i>	
4.5. Resultados de la actividad antiinflamatoria.....	
4.6. Resultados de la actividad antiinflamatoria en procesos crónicos.....	
4.6. Resultados de la actividad Inmunomoduladora.....	
V. DISCUSIÓN.....	
VI. CONCLUSIONES.....	
VII. RECOMENDACIONES.....	
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
IX. ANEXOS.....	

RESUMEN

Objetivos: Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta". **Diseño:** estudio experimental. **Lugar:** Facultades de Farmacia y Bioquímica y de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. **Material Biológico:** ratas Holtzman. **Intervenciones:** se realizó la identificación y elucidación estructural de metabolitos secundarios y se determinó la actividad antioxidante *in vitro* por el método del difenilpicrilhidrazil (DPPH). Se agrupó 42 ratas con pesos de 200 a 250 g, en seis grupos de siete cada uno y se midió la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la lipoperoxidación. En la actividad antiinflamatoria se empleó el método del edema subplantar según Winter y el test de granuloma según Sedwick inducido por carragenina; y para la actividad inmunomoduladora el método de velocidad de aclaramiento de la tinta china. **Principales resultados:** se identificó flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas. Con el análisis espectroscópico UV se elucidaron los flavonoides: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona; 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona. La DL_{50} se ubica por encima de 2000 mg/kg, considerándose el extracto como no tóxico y no Clasificado. La actividad antioxidante *in vitro* de 86.4% (300 ug/mL) e *in vivo* aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (2146.8 UI/ ml sangre), SOD (10.12 UI/ml sangre) y reduce la lipoperoxidación como MDA (3.6 umol/ml sangre). La mayor eficiencia antiinflamatoria fue a 300 mg/kg (39.1 %); y la eficiencia Inmunomoduladora de 48.23% (200 mg/kg) respectivamente. **Conclusiones:** *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" manifiesta actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, que la ubica como una especie nativa muy importante en la línea de los recursos naturales.

Palabras clave: *Chuquiraga lessing*, huamanpinta, antiinflamatoria, inmunomoduladora, enzimas antioxidantes, lipoperoxidación.

SUMMARY

Objectives: To determine the antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity of chloroform extract of the leaves of *Chuquiraga lessing* "huamanpinta". **Design:** experimental study. **Location:** faculty of Pharmacy and Biochemistry and Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Peru. **Biological Material:** Holtzman rats. **Interventions:** Identification and structure elucidation of secondary metabolites was performed and antioxidant activity in vitro was determined by the method of difenilpicrilhidrazyl (DPPH). 42 rats weighing 200 to 250 g were grouped into six groups of seven each and the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and lipid peroxidation was measured. Antiinflammatory activity in the method according Winter subplantar edema and granuloma test according Sedwick Carrageenan was used; and immunomodulatory activity for the method of speed ink clearance. **Main outcomemeasures:** Flavonoids, triterpenes, steroids, alkaloids, tannins, phenolic compounds, sesquiterpene lactones were identified. With UV spectroscopic analysis flavonoids were elucidated: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona; 4',5,7,8-tetrahidroxi-flavona; 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona. The LD₅₀ is above 2000 mg / kg, the extract considered as non-toxic and Unclassified. The in vitro antioxidant activity of 86.4% (300 ug / mL) and in vivo increases the activity of antioxidant enzymes CAT (2146.8 IU / ml blood), SOD (10.12 IU / ml blood) and reduces lipid peroxidation as MDA (3.6 umol / ml blood). Most inflammatory efficiency was 300 mg / kg (39.1%); Immunomodulatory and efficiency of 48.23% (200 mg / kg) respectively. **Conclusions:** *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" manifest anti-inflammatory and immunomodulatory activity, which places it as a very important line of natural native species.

Key words: *Chuquiraga lessing*, huamanpinta, anti-inflammatory and immunomodulatory, activity antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

RESUMO

Objetivos: Determinar a actividade antioxidante, anti-inflamatória e imunomodulatória de extracto clorofórmio, as folhas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta". **Desenho:** Estudo Experimental. **Localização:** faculdade de Farmácia e Bioquímica e Medicina, Universidade Nacional de San Marcos, Lima- Peru. **Material Biológico:** Ratos Holtzman. **Intervenções:** foi realizada a identificação e elucidação da estrutura dos metabolitos secundários e actividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelo método de difenilpicrilhidrazil (DPPH). Foram agrupados 42 ratos pesando entre 200 a 250 g em seis grupos de sete cada uno e foi medido a actividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidação lipídica. Em a Actividade anti-inflamatória foi usada o metodo de edema subplantar de acordo com Winter e o teste de granuloma de acordo com Sedwick inducido por carragenina, e atividade imunomoduladora por o método de velocidade liberação de tinta china. **Principais resultados:** Foram identificados flavonóides, triterpenos, esteróides, alcalóides, taninos, compostos fenólicos, lactonas sesquiterpênicas. Com análise de espectrofotometria UV foram elucidados os flavonoides: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona; 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona. A DL₅₀ é superior a 2000 mg/kg, considerado o extracto como não-tóxico e não classificados. A actividade antioxidante *in vitro* de 86,4 % (300 ug/mL) e *in vivo*, aumenta a actividade de enzimas antioxidantes CAT (2146,8 IU/ml de sangue) , a SOD (10,12 UI/ml de sangue) e reduz a peroxidação lipídica como MDA (3,6 umol/ml de sangue). Mais eficácia anti-inflamatória foi de 300 mg/kg (39,1%); e eficiência imunomodulador de 48,23% (200 mg/kg), respectivamente. **Conclusões:** *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" manifesta atividade anti-inflamatório e imunomoduladora, o que o coloca como uma linha muito importante de espécies nativas naturais.

Palavras-chave: *Chuquiraga lessing*, huamanpinta, anti-inflamatórios, imunomoduladore, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica.

I. INTRODUCCIÓN

La alta diversidad de especies vegetales con importantes propiedades terapéuticas ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular¹. Esto deriva en la búsqueda y obtención de drogas alternativas que presenten menos efectos colaterales que los fármacos convencionales y de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan plantas medicinales nativas².

Siendo los metabolitos secundarios de las plantas medicinales los responsables de sus diversos efectos terapéuticos que se les atribuyen, se hace necesario extraerlos, purificarlos y elucidar su estructura química empleando métodos modernos de la fitoquímica^{3,4}.

La *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” es una especie con uso terapéutico de la familia de las Asteraceae, crece en los andes del Perú sobre los 3500 msnm, y es utilizado como antiinflamatorio, analgésico, diurético, antiprostático, cáncer genitourinario, etc^{5,6}.

En la presente investigación se evaluó la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, ya que la inflamación es el resultado de la interacción de células y otros factores presentes en los tejidos en respuesta a una injuria externa, con producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs). Entre los posibles mecanismos subyacentes de este desbalance está el inadecuado metabolismo del ácido araquidónico, el cual vía la enzima ciclooxigenasa (COX) genera mediadores pro-inflamatorios sindicados para la mayoría de eritemas causados durante la inflamación aguda⁷.

La determinación de la actividad antiinflamatoria se hizo en modelos *in vivo* mediante los métodos de “edema subplantar de la pata trasera” (inflamación aguda) y “bolsa de aire subcutánea” (inflamación crónica) inducidos por carragenina, ampliamente usados para la evaluación pre-clínica de fármacos antiinflamatorios⁸. La actividad inmunomoduladora se determinó por el método de la velocidad de aclaramiento de la tinta china en sangre de ratas⁹, y la actividad antioxidante se determinó *in vitro* por el método del DPPH e *in vivo* midiendo la actividad de las enzimas Superóxido dismutasa (Marklund y Marklund), la catalasa (Aebi) y la lipoperoxidación por el método de TBARS (Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico), el cual está basado en la formación del malondialdehído (MDA) como producto final de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, y su concentración es una medida establecida de la peroxidación de lípidos¹⁰.

1.1. Situación Problemática

El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones de los medios como agentes biológicos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, traumatismos, lesiones térmicas o fisicoquímicas de diversa índole, etc. Cada tipo de estímulo provoca una respuesta característica que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno. La respuesta inflamatoria ocurre en tres fases distintas, cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos¹¹, y la habilidad para desencadenar una reacción inflamatoria es esencial para la supervivencia de los organismos, aunque en algunas enfermedades tal reacción puede llegar a ser exagerada y sin un aparente beneficio para el organismo¹².

Existen trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria realizados tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*¹³, por lo que se hace necesario seguir investigando sobre moléculas con estas propiedades.

El término inmunidad se refiere al estado de un hospedero con capacidad de reaccionar frente a un agresor y a las consecuencias que se derivan¹⁴, la memoria inmunológica específica, permite una mejor respuesta al agente infeccioso en una segunda infección¹⁵. La inmunomodulación se refiere a la acción que ejerce la medicación sobre los procesos de autorregulación que dirigen el sistema de defensa inmunitario¹⁴. Sobre la actividad inmunomoduladora de los productos naturales, se han publicado un elevado número de trabajos que sugieren que las plantas o sus componentes pueden ser importantes en el descubrimiento de nuevos fármacos innovadores con actividad inmunomoduladora y dilucidar mecanismos de acción novedosos¹⁵.

Entre la gran variedad de especies vegetales de interés terapéutico se encuentran las plantas del género *Chuquiraga* (Asteraceae), de las que su uso medicinal ha sido respaldado por estudios científicos realizados en varios modelos experimentales, mediante los cuales se han comprobado algunos efectos biológicos y farmacológicos ya descritos en la literatura¹⁶.

1.2. Formulación del Problema

La investigación sobre plantas medicinales ha adquirido relevancia por la pérdida acelerada del conocimiento tradicional y la reducción de la disponibilidad de muchas especies útiles, como consecuencia de la degradación de los bosques tropicales y otros hábitats naturales. La *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, que crece en los andes del Perú es considerada como una especie nativa útil para el desarrollo de nuevos medicamentos. La actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área de la farmacología por la capacidad de ciertos metabolitos secundarios de interferir en la evolución de enfermedades, por lo que formulamos los siguientes problemas:

1.2.1. Problema general

¿Cómo determinar la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cómo extraer e identificar los metabolitos secundarios, presentes en las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?
2. ¿Cómo elucidar la estructura química de algunos metabolitos secundarios, presentes en las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?
3. ¿Cómo determinar la toxicidad del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?
4. ¿Cómo determinar la actividad antioxidante del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?
5. ¿Cómo evaluar la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”?

1.3. Justificación teórica

La inflamación es un fenómeno desagradable y doloroso, una respuesta fisiológica de carácter defensivo del organismo ante determinadas situaciones adversas que se produce por la necesidad de que lleguen a la zona dañada células defensoras y reparadoras¹⁰. Uno de los principales componentes defensivos del cuerpo y copartícipe de la inflamación es el sistema inmune; responsable de la protección del organismo frente a agentes extraños, fundamentalmente gérmenes y está formado por células (leucocitos, macrófagos, polimorfonucleares), inmunoglobulinas o anticuerpos, el tejido inmunitario y las citoquinas responsables del proceso bioquímico que se necesita para que ocurra dicha respuesta inflamatoria-inmunológica.

El tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias e inmunológicas ha llevado a la búsqueda de nuevos componentes antiinflamatorios e inmunomoduladores y es aquí donde las plantas medicinales juegan un papel importante como fuente principal de sustancias activas. Existen estudios sobre las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de otras especies como *Aloe vera*, Propóleo de *Apis mellífera* y de la *Uncaria tomentosa* “uña de gato”¹⁷.

Por ello es relevante estudiar la actividad antiinflamatoria y relacionarlo con el mecanismo primario de inmunidad de diversas especies vegetales del departamento de Ayacucho que podrían emplearse para modular el proceso inmunológico del organismo como la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

1.4. Justificación práctica

El género *Chuquiraga* (Asteraceae) presenta diversas especies las cuales han sido estudiadas por varios autores^{4,5,6} los que han demostrado que presentan buenos efectos farmacológicos como el antiinflamatorio y antioxidante pero no se ha estudiado el efecto inmunomodulador de sus extractos.

Asimismo los diversos extractos del género *Chuquiraga*, contienen metabolitos secundarios⁴ muy importantes desde el punto de vista farmacológico, que serían los responsables de sus efectos farmacológicos como antiinflamatorios, antioxidantes⁵ que confirma su uso popular con estos fines; por lo que en el presente estudio se pretende evaluar el efecto del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* en modelos antiinflamatorios e inmunomoduladores y a su vez elucidar la estructura química de algunos metabolitos secundarios importantes.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Extraer e identificar los metabolitos secundarios, presentes en las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.
2. Elucidar la estructura química algunos metabolitos secundarios, presentes en las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.
3. Determinar la toxicidad del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.

4. Determinar la actividad antioxidante del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.
5. Evaluar la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto de las hojas de la *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

R. Casado et al. (2011)⁴, encontró que el extracto acuoso y metanólico al 50% de las partes aéreas de *Chuquiraga spinosa* presento una alta actividad antioxidante sin correlación entre la actividad antioxidante y el total de compuestos polifenólicos. Así mismo el extracto metanólico al 50% administrado por vía oral redujo significativamente (52,5%) el edema subplantar inducido en la pata trasera en ratas. Este extracto, por administración tópica, produjo una reducción de 88,07% del edema inducido por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-Acetato (TPA) en orejas de los ratones. El extracto acuoso y metanólico al 50% fueron activos contra *Cándida albicans* (MIC: 2,5 y 6,25 g, respectivamente) y el extracto acuoso mostró actividad antifúngica contra *Cándida cucumerinum* (MIC: 2,5 g).

M. Chávez et al. (2011)⁵ estudiaron los metabolitos secundarios bioactivos de *Chuquiraga spinosa Lessing subsp. Huamanpinta Ezcurra*, reportan que el extracto de acetato de etilo contenía los flavonoides: 5,5'-dihidroxi-7,3'-dimetoxi-flavanona y 5-hidroxi- 7,4'-dimetoxiflavona, el flavonoide quercetina y kampferol y del extracto etanólico se aisló el flavonoide rutina y los flavonoides de tipo glicósido como quercetina 3-O-rutinosido, kampferol 3-O-rutinosido y kampferol 3-O-glucosido. Los flavonoides aislados del extracto de acetato de etilo y etanólico de *Chuquiraga spinosa lessing subsp "huamanpinta"* son los responsables de la actividad antiinflamatoria y analgésica reportadas previamente por los autores^{4,5}.

M. Torres (2004)⁶, demostró la actividad antiinflamatoria del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa lessing "qarisirwi"* en *Canis*

familiaris, indicando que los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad serían los triterpenos y esteroides.

C. Contreras (2003)¹⁸, reportó que los extractos de *Chuquiraga spinosa* Lessing, tienen actividad antiinflamatoria, el extracto acuoso demostró mayor eficiencia farmacológica y que este extracto a la dosis de 200 mg/Kg, reporta mayor eficiencia antiinflamatoria.

J. Arenas (2000)¹⁹, demostró la actividad diurética de la *Chuquiraga spinosa* y concluyó que probablemente los responsables de dicha actividad serían los flavonoides en acción sinérgica con las saponinas, fenoles y taninos.

C. Sotelo (1998)²⁰, estudió la “actividad antiinflamatoria de la *Chuquiraga spinosa* “huamanpinta” en ratas y camundongos, empleando el modelo experimental de inflamación producida por carragenina, demostró una buena actividad antiinflamatoria e indica que es un mecanismo dosis dependiente, de igual forma concluye que la fracción acuosa tiene mejor actividad antiinflamatoria que la fracción etanólica y describe que ambas fracciones poseen actividad antiedematogénica. La administración del Extracto Bruto Hidroalcohólico (EBH) de huamanpinta (2000 mg/kg SC) produjo lesiones de la mucosa gástrica similares a los producidos por la indometacina, lo que sugiere un mecanismo de acción antiinflamatoria mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Se ha estudiado la actividad inmunomoduladora *in vitro* de muchos extractos derivados de plantas como: *Sylibum marianum*, *Matriacria chamomilla*, *Cichorium intybus* (Amir Jhofran et al. 2000)²¹, *Plantago lanceolata*, *Rudbeckia fulgida*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* (Ebringerova et al. 2003)²², *Dioscoreas batatas* (Choi et al. 2004)²³, y la actividad inmunomoduladora *In vivo* de extractos como *Boerhavia diffusa* (Mungantiwar et al. 1999)²⁴, *Croton macrostachyus*, *Croton megalocarpus* y *Phytolacca dodecandra*, los autores indican que los extractos mencionados muestran actividad mitogénica sobre linfocitos *in vivo* y/o *in vitro*.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Chuquiraga lessing*

Es una planta semileñosa de 1 a 1.5 metros de alto. El tallo muy ramificado, densamente folioso. Las hojas de disposición uniformemente alternas simples enteras de pecíolo corto de forma aovada con borde entero con una longitud de 1.5 mm de diámetro de color verde intenso y brillante, con espinas axilares. Flores de color amarillo-anaranjado, con anteras sagitadas, corolas bilabiadas. Pero una de sus características más sobresalientes es por la partidura del disco del capítulo. Inflorescencia en cabezuela o capítulos rodeada de tres hileras de brácteas involucrales con numerosas flores, sésiles, dispuestas en las axilas de las hojas²⁵.

Los capítulos femeninos con involucro cilíndrico y con brácteas dispuestas más o menos en cinco series, las externas aovadas y las internas angostamente aovadas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores en escaso número con la corola algo filiforme. Aquenios glabros con un disco anular en la parte superior y lateralmente. Papus de color algo amarillento. Capítulos masculinos con involucro cilíndrico con brácteas dispuestas en tres series, las externas e internas elípticas 5 estambres con los filamentos libres y soldados por las anteras (sinanterio), receptáculo cónico alveolado de 1.5 mm de diámetro²⁵.

2.2.2. *asificación Sistemática de la Especie*

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA

CLASE : MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE : ASTERIDAE

ORDEN : ASTERALES

FAMILIA : ASTERACEAE

GENERO : Chuquiraga

ESPECIE : ***Chuquiraga lessing***

Nombre vulgar: “huamanpinta”, “jarisirwi”.

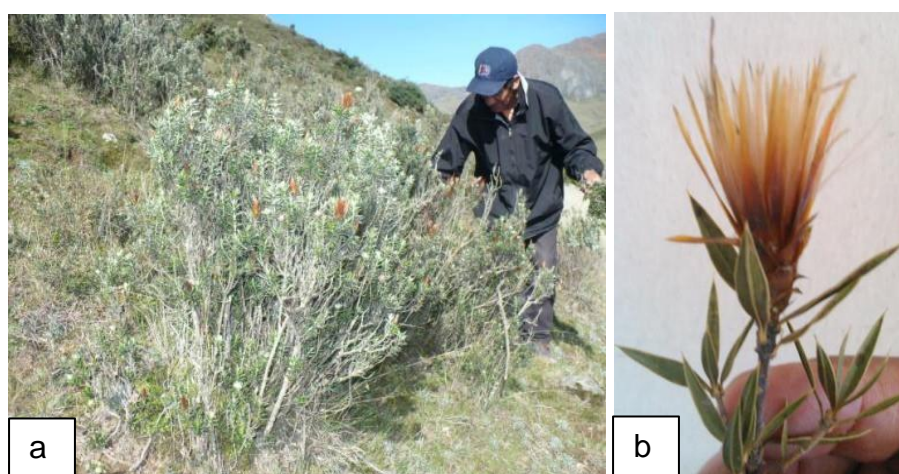


Figura 1: *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”

- a) Especie de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” en las alturas de Vinchos-Ayacucho a 3900 msnm.
- b) Tallo, hojas y flores de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

2.2.3. *ución Geográfica y Hábitat*

La especie de la planta se ha encontrado en diferentes localidades de Ayacucho como Quinua, Chiara, Vinchos; en la provincia de Cangallo en el distrito de Totos, por encima de los 3,000 metros sobre el nivel del mar. Habita en zonas escarpadas y pedregosas, se relaciona con algunas especies arbustivas como el *Gynoxis*, *Baccharis*, etc. Su zona de vida es, el bosque húmedo montano subtropical, también se le encuentra entre el límite de la zona de vida ya mencionada y el páramo muy húmedo subandino subtropical²⁵.

2.2.4. *posición química y usos tradicionales.*

Algunos autores reportan^{4,5} que la composición química de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” contiene: alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, taninos, sesquiterpenolactonas, aminoácidos y resinas. Tiene además potasio, calcio, fósforo, azufre y silicio. Se coloca 15 g de las hojas para un litro de agua, hervir por 3 a 5 minutos y se toma una taza tres veces al día y se emplea como: Antiinflamatorio de las vías urinarias, antiinflamatorio prostático, cicatrizante, antiséptico vaginal⁶.

2.2.5. inflamación.

La inflamación es la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos, como los patógenos, las células dañadas, los traumas físicos o irritantes²⁶, se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno. La sobreproducción de estas últimas puede inducir estrés oxidativo y generar daños a nivel celular, que promueven la aparición de enfermedades crónicas^{27,28}. A nivel macroscópico, la inflamación generalmente se caracteriza por la presencia de calor, dolor, rubor, tumefacción (hinchazón) y alteración o pérdida de la función en el área afectada²⁹.

La intensidad de la respuesta inflamatoria es crucial: si es insuficiente puede conducir a las infecciones y cáncer. Por otro lado, un exceso de respuesta causa morbilidad y mortalidad que acompañan a las enfermedades con un importante componente inflamatorio, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la isquemia cerebral y del corazón, las enfermedades de Crohn y Alzheimer. En algunos casos, la respuesta inflamatoria alcanza la circulación sistémica, como en la sepsis, meningitis y muchos otros traumas³⁰. En estos casos, la inflamación puede ser mucho más dañina para el organismo que el estímulo original.

2.2.5.1. Mecanismos de la inflamación

Innumerables mecanismos participan en el desencadenamiento y la resolución del proceso inflamatorio, éstos son muy complejos, varían de un tejido a otro y dependen del agente etiológico. Los mecanismos comunes incluyen la liberación de diversos mediadores, los estímulos quimiotácticos, la fagocitosis y la liberación de enzimas lisosomales, así como la activación de las vías de la coagulación, la fibrinolítica, de las cininas y del complemento. Las células endoteliales activadas intervienen decisivamente en la biodegradación de células circulantes hacia los sitios de inflamación, así como en la producción de selectinas, integrinas y en la superfamilia de

inmunoglobulinas. La expresión de las moléculas de adherencia varía según los tipos celulares que intervienen en la reacción inflamatoria³⁰.

2.2.5.2. Inflamación aguda y subaguda tardía

Tienen una duración relativamente corta, desde unos minutos a varias horas o uno o dos días, y sus principales características son la vasodilatación local transitoria, la mayor permeabilidad capilar, la exudación de líquido y proteínas plasmáticas y la emigración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos. Independientemente de la naturaleza del agente lesivo, estos tipos de inflamación son bastante estereotipados¹⁰.

La respuesta inflamatoria se produce en el tejido conjuntivo, hacia el cual filtran el plasma y los elementos formes de la sangre desde los vasos sanguíneos lesionados por la agresión o desde los vasos que se hacen más permeables en respuesta a la lesión. Se produce así, el enrojecimiento por la dilatación de los vasos, el hinchamiento (edema) por el escape de líquido a los tejidos blandos y el endurecimiento por la acumulación de los líquidos y las células¹¹. Estos fenómenos desembocan en la pérdida de la capacidad normal de los vasos sanguíneos para retener en su interior las células y los líquidos; pero estos cambios no significan obligatoriamente una alteración estructural del vaso.

La evolución del proceso inflamatorio puede seguir reversiblemente diferentes rutas. Lo ideal es la resolución, que consiste en el restablecimiento de la normalidad tisular y funcional, por lo que se requiere una organización y restablecimiento de la permeabilidad vascular, el cese de la migración leucocitaria, la apoptosis de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) extravasados y la eliminación de los mediadores químicos; entonces el restablecimiento se logra por la acción del drenaje linfático y la digestión macrofágica que conducen a la eliminación del edema, las células inflamatorias y los restos necróticos. Por último, si el agente patógeno persiste, la respuesta inflamatoria aguda podría convertirse en una respuesta inflamatoria crónica³¹.

2.2.5.3. Inflamación crónica

Es una reacción lenta y latente que continua durante meses e incluso años y supone la destrucción tisular, así como la proliferación local de las células y del tejido conjuntivo. Se caracteriza por la presencia constante de linfocitos, monocitos y células plasmáticas, debido a que el estímulo nocivo ha sido persistente, la presencia de estas células inflamatorias puede dar lugar a alteraciones funcionales del tejido, ya sea por la acción directa de los mediadores producidos por las células linfoides o bien por el depósito continuo de colágeno por los fibroblastos debida a la cicatrización¹¹.

Los principales tipos celulares que se encuentran en las zonas de inflamación crónica son las células mononucleares y las células anormales derivadas de los macrófagos. En las zonas de la cicatrización y la inflamación crónica están activos diversos factores de crecimiento; existe angiogenia y también una mayor actividad de los fibroblastos, que se encuentran por debajo del tejido fibroso. Los mediadores más importantes en la cicatrización, en los procesos de reparación y las reacciones inflamatorias crónicas son, entre otros, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el de crecimiento del endotelio vascular, el de crecimiento transformador, el de crecimiento tumoral-beta ($\text{TGF-}\beta$) y varios factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)^{30,31}.

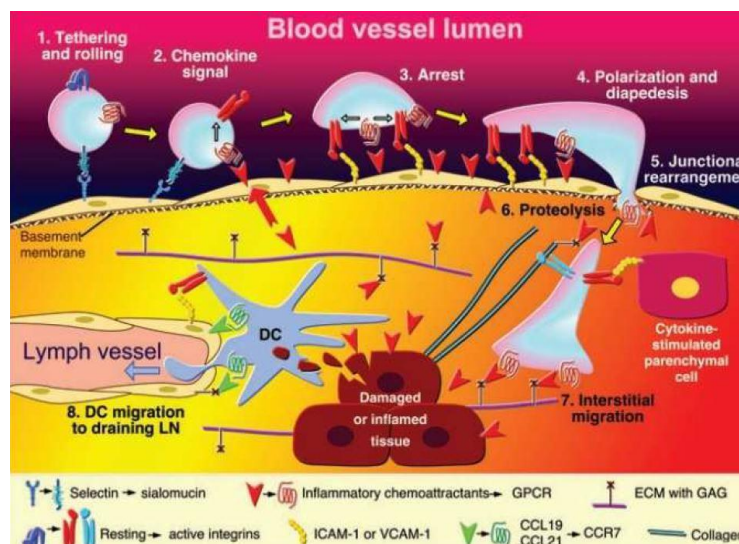


Figura 2: Etapas de la inflamación

Fuente: J Ethnopharmacology 2008, 118: 514-521

2.2.6. Rol de las especies reactivas en la inflamación

Durante la inflamación existe una generación excesiva de radicales libres, provenientes de diferentes fuentes, las cuales a su vez participan activamente en la evolución del proceso inflamatorio y sus consecuencias. Los metabolitos reactivos del oxígeno elaborados en los neutrófilos y macrófagos pueden ser liberados tras la exposición a los agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis²⁸. Además del rol defensivo de las especies reactivas del oxígeno (EROs) como microbicidas, éstas son el estímulo más potente que incrementa la permeabilidad vascular, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-8, IL-1 β) que a su vez estimulan más producción de EROs, de factores quimiotácticos (LB4), activan las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial, inactivan antiproteasas como la α -1-antitripsina lo cual incrementa la destrucción de los componentes tisulares como la elastina, provocan peroxidación lipídica en las membranas plasmáticas y oxidación del DNA. De esta forma, las EROs desregulan las funciones celulares e inducen daño tisular, lo cual incrementa en estado de inflamación³².

Las EROs promueven la actividad de los factores proinflamatorios nucleares sensibles a cambios redox, incluyendo el factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B)³³. Este a su vez aumenta la expresión del gen codificante de la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), que promueve la síntesis de óxido nítrico (NO, gas considerado un radical libre) por las células endoteliales, lo cual determina la vasodilatación. El NO tiene una acción corta y local. También es producida por los macrófagos, ya que las interleucinas activan las sintasas del NO; cuando éstas se liberan en cantidades incontroladas, se producen vasodilatación periférica y necrosis tisular³¹.

La inflamación crónica es una de las principales causas de cáncer e investigaciones han demostrado que el mecanismo de acción involucra la participación de agentes oxidantes³⁴. La sobreproducción de oxidantes conduce también a una depleción de los sistemas antioxidantes endógenos. Por lo tanto, la influencia de los radicales libres en una determinada reacción

inflamatoria depende del equilibrio entre la producción e inactivación de estos metabolitos por las células y tejidos a través de sus mecanismos protectores antioxidantes³⁰.

2.2.7. *macos antiinflamatorios*

Son moléculas químicamente diferentes y pero con efectos farmacológicos y reacciones adversas comunes¹¹, que disminuyen el proceso inflamatorio y las dos clases más importantes de agentes farmacológicos que inhiben la respuesta inflamatoria aguda, subaguda o crónica son:

2.2.7.1. *Fármacos antiinflamatorios esteroideos o corticoesteroides.* Son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos caminos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y IL- 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, eotaxina y la citoquina³⁵, inhiben la actividad de la fosfolipasa A₂ y la expresión de la ciclooxigenasa 2, mientras que la ciclooxigenasa 1 se ve poco afectada por los corticoides. Aunque inicialmente se pensó que los glucocorticoides inhibían directamente la actividad de la fosfolipasa A₂, se sabe que en realidad la inhiben de forma indirecta, al aumentar la síntesis de determinadas proteínas de la familia de la anexina, de las cuales la mejor conocida³⁵ es la lipocortina 1.

2.2.7.2. *Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).* Las drogas analgésicas antipiréticas antiinflamatorias no esteroideos (AINEs) son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa^{35,36}.

Estas drogas comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes, también son llamadas drogas "tipo aspirina"; otra denominación común para este grupo de agentes es el de "AINEs" (antiinflamatorios no esteroideos) o drogas "anticiclooxigenasa" debido a que inhiben esta

enzima, responsable de la síntesis de prostaglandinas, las cuales son mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación³⁶.

Los principales efectos terapéuticos de los AINE provienen de su capacidad de inhibir la biosíntesis y liberación de prostaglandinas como mediadores de la inflamación (al inhibir con mayor o menor potencia y especificidad, las isoformas de la COX), así como la disminución inespecífica de la permeabilidad, ya que las prostaglandinas actúan como factores inmediatos de la inflamación y son las responsables del dolor, la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la fiebre³⁵. La primera enzima en la vía de síntesis de las prostaglandinas (PG) es la sintasa de prostaglandina G/H, llamada también ciclooxigenasa (COX), enzima que transforma el ácido araquidónico (liberado de las membranas celulares, debido a la presencia del estímulo nocivo) en los productos inestables PGG₂ y PGH₂, y que culmina en la producción de TXA₂ y diversas prostaglandinas. Se conocen dos isoformas de COX, la COX-1 que es constitutiva y la COX-2 que es inducible³⁶.

Los antiinflamatorios no esteroideos, en concentraciones altas, también aminoran la producción de radicales superóxido, inducen la apoptosis, inhiben la expresión de moléculas de adherencia, disminuyen la cantidad de citocinas proinflamatorias (como TNF- α , IL-1); modifican la actividad de linfocitos y alteran otras funciones de la membrana celular. Sin embargo, difieren las opiniones en cuanto a que las acciones mencionadas puedan contribuir a la actividad antiinflamatoria de dicho grupo de fármacos en las concentraciones que se logran en el uso clínico³⁰.

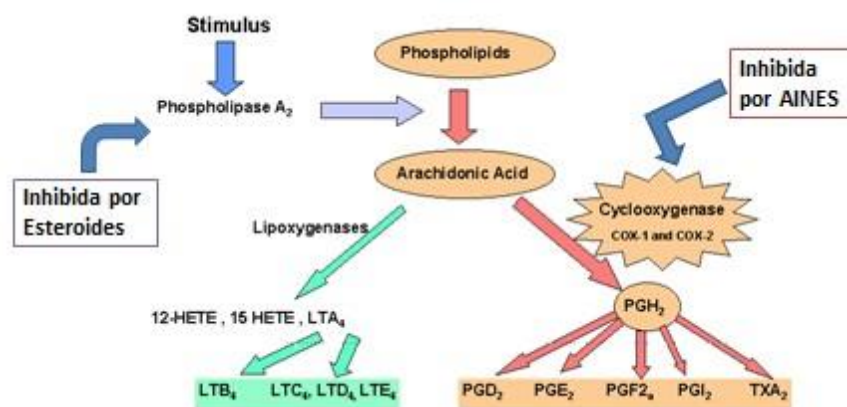


Figura 3: Mecanismo de acción de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos.

Fuente: J Ethnopharmacology 2008, 118: 514-521

2.2.8. icales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivientes³⁷. Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como EROs (el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito) entre otros, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico. Los radicales libres también son generados por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas³⁸.

En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante. Cuando la capacidad de control de las sustancias oxidantes es superada, se establece una situación

conocida como estrés oxidante. El estrés oxidante es una condición que se manifiesta en el organismo cuando la producción de sustancias altamente reactivas supera los mecanismos antioxidantes y está relacionada con numerosas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares³⁹.

2.2.8.1. Biomecanismos de formación de radicales libres

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical $\cdot\text{OH}$ que es generado siempre que el H_2O_2 entra en contacto con iones cobre (Cu^{+2}) o iones hierro (Fe^{+2}); ya que el H_2O_2 y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el $\cdot\text{OH}$ puede ser formado *in vivo*³⁹.

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Si más del 95% del O_2 consumido por las células de nuestro organismo es reducido vía acuosa, citocromo oxidasa mitocondrial, completamente a H_2O durante la respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje (<5%) es convertido a ERO. Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar a los tejidos corporales^{40,41}.

2.2.8.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)

El oxígeno es indispensable para los organismos aeróbicos, pero a su vez es potencialmente tóxico para todos los seres vivos. El oxígeno molecular (O_2) tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, su reactividad

resulta de esta propiedad biradical³⁷. Debido a su labilidad química, puede dar origen a ERO, que engloban radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}), el radical perhidroxilo (HO_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y compuestos no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), el ozono (O_3) y el ácido hipocloroso ($HClO$). La capacidad prooxidante de cada radical libre está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad. De este modo, el radical hidroxilo reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad y baja especificidad y su peligro dependerá del compartimento celular en el que se origine o las moléculas a las que ataque³⁷. Especies menos reactivas, como el $O_2^{\cdot-}$, reaccionan con menor eficacia pero de forma mucho más específica y selectiva, afectando a enzimas como la xantina oxidasa y la aldehído oxidasa. Se ha observado su participación en numerosos procesos citotóxicos, a pesar de ser una especie menos reactiva que otros radicales. Tal parece que es un agente que no actúa directamente, sino que, al metabolizarse por la SOD a H_2O_2 puede actuar por sí mismo como fuente de otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición⁴².

Por otra parte, el representante más sobresaliente de las ERN es el óxido nítrico ($\cdot NO$), ya que interviene en diversas funciones biológicas, participa como constituyente del factor relajante derivado del endotelio, el cual puede relajar la musculatura lisa vascular, inhibir la agregación plaquetaria y disminuir/inhibir la transmisión del mensaje neuronal; también es importante en la respuesta inmune, pues los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos⁴³. El $\cdot NO$ es producido en organismos superiores por la oxidación de una de las terminales de los átomos de nitrógeno-guanidino de la L-arginina, proceso catalizado por la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (sNO). Bajo ciertas condiciones el $\cdot NO$ puede ser convertido a otras ERN, tales como: el catión nitrosonium (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), peroxinitrito ($ONOO^-$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2). Algunos de los efectos fisiológicos son mediados a través de la formación intermediada de S-nitroso-cisteína o S-nitroso-glutación⁴⁴.

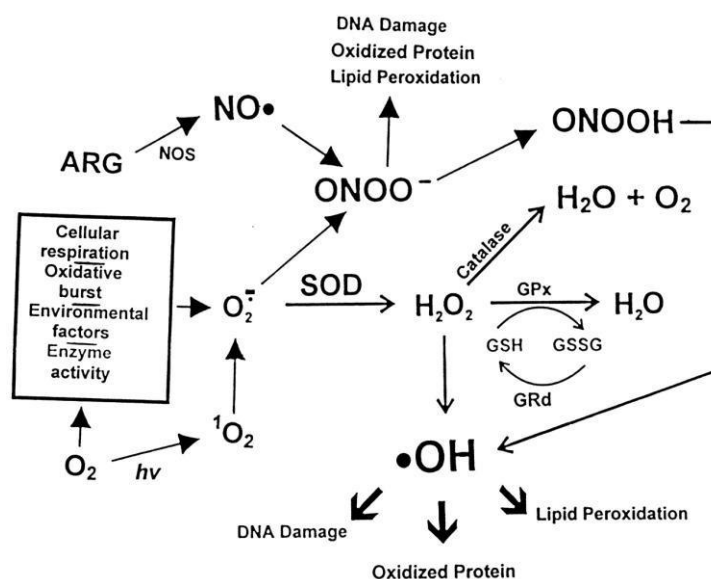


Figura 4: Mecanismos de formación y eliminación de ROS y otros radicales libres dentro de la célula.

Fuente: An Fac Med 2009.

2.2.9. tioxidantes

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares. Se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres⁴⁵.

El sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio y flavonoides son las moléculas químicas antioxidantes más conocidas⁴⁶.

El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes endógenas incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa. La superóxido dismutasa es una metaloenzima ampliamente encontrada en células procariontes y eucariontes, que permite la dismutación del ion superóxido en peróxido de hidrogeno y cuya

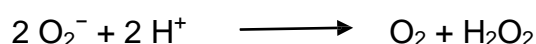
acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutation peroxidasa, transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado⁴⁶.

2.2.9.1. Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes forman parte del sistema de defensa antioxidante endógeno de los organismos y ha surgido a lo largo de la evolución de las especies como mecanismo de protección frente al daño originado por las ROS. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: las superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc (Cu,ZnSOD) y manganeso (MnSOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el enzima málico (ME)⁴⁶.

2.2.9.2. Superóxido dismutasa

La SOD es un componente muy importante del sistema antioxidante, su función consiste en catalizar la dismutación del O_2^- a H_2O_2 en la siguiente reacción:



La familia de las SOD se conforma por las SOD dependiente de Cu y Zn (CuZnSOD) que se encuentra en el citosol de las células eucariotas, la SOD dependiente de Mn (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial en eucariotas y la SOD dependiente de Fe (SOD) en bacterias aerobias. Recientemente se ha propuesto que la ausencia en la expresión del gen SIRT3 puede alterar la actividad de la MnSOD. La SIRT3 es una proteína que pertenece a las sirtuinas una familia de 7 proteínas desacetilasas dependientes de NAD^+ ; comparten un dominio catalítico de 275 aminoácidos y se encuentran en el núcleo (SIRT1, 6 y 7), mitocondria (SIRT 3, 4 y 5) y citosol (SIRT 2)⁴⁷.

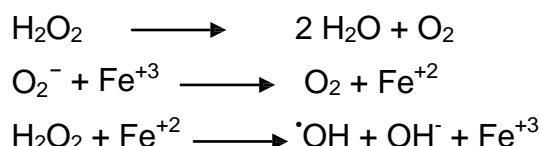
Además se ha visto que la función mitocondrial está regulada por acetil transferasas y desacetilasas, como las sirtuinas por lo consiguiente están involucradas en la producción de energía y EROs para que la síntesis de ATP coincida con los requerimientos intracelulares^{48,49}. De tal manera que

siendo la desacetilasa más importante, ha sido propuesto que SIRT3 puede actuar como proteína de mantenimiento que determina el control de las funciones mitocondriales como la regulación de la respiración, aclaramiento metabólico y posiblemente el inicio de una respuesta protectora y/o reparadora⁵⁰.

Por otra parte, se ha propuesto que SIRT3 protege contra el ataque por ERO al potenciar la actividad del sistema de defensa antioxidante⁵⁵. El gen SIRT3 regula las propiedades enzimáticas de MnSOD ya que disminuye su desacetilación por lo tanto aumenta su actividad, es decir, aumenta la detoxificación del O_2^- . También se ha demostrado que la MnSOD interactúa físicamente con SIRT3 porque la lisina 122 es desacetilada por SIRT3 sugiriendo que al menos la desacetilación de esta lisina en parte regula la función de MnSOD^{50,51}.

2.2.9.3. Catalasa

Cataliza la conversión del H_2O_2 en H_2O . En ausencia de esta enzima el H_2O_2 acumulado reacciona con metales como Fe^{+2} y Cu^{+2} que se encuentran en el medio para producir el radical $\cdot OH$, este tipo de reacciones se les conoce como Fenton. La catalasa⁵¹ se encuentra en mayor proporción en el peroxisoma (80%) y en menor proporción en el citosol (20%) y está en mayor concentración en hígado, riñón y eritrocitos. Las reacciones en las que participa son las siguientes:



2.2.10. El sistema inmunológico

Por respuesta inmune se entiende como el conjunto de mecanismos de defensa que le permiten a un organismo protegerse de los microorganismos que encuentra en su medio ambiente⁵², evitar el desarrollo de células tumorales y eliminar moléculas nocivas originadas en su interior como consecuencia del envejecimiento, infecciones, traumatismo o crecimiento neoplásico. El sistema inmune está involucrado en la etiología, así como en

los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades⁵³. Según se haya desarrollado esta inmunidad, habrá que considerar una inmunidad innata o natural y una inmunidad adaptativa o adquirida.

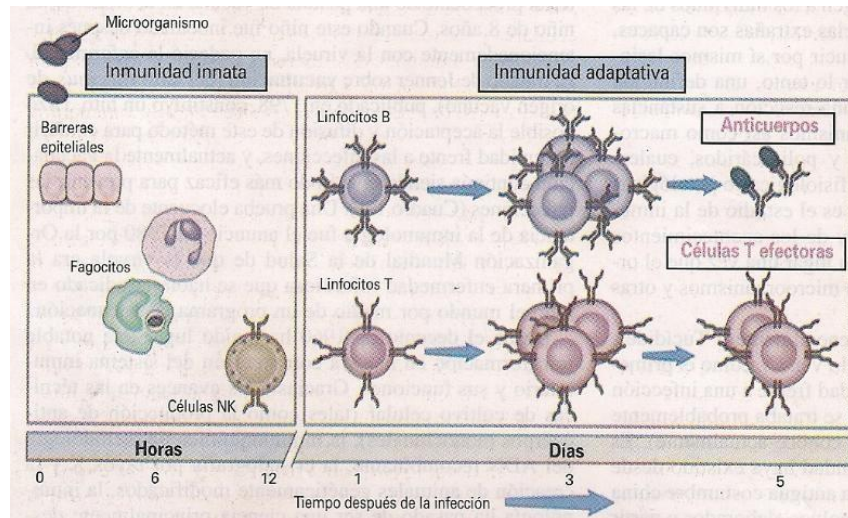


Figura 5: Inmunidad innata y adaptativa.

Fuente: Abbas, A. Inmunología celular y molecular, 2002.

2.2.10.1. Inmunidad innata.- Denominada también inmunidad natural o nativa, es la primera línea de defensa del huésped frente a los microorganismos⁵⁴. Está constituida por mecanismos existentes antes de que se desarrolle la infección, capaz de establecer respuestas rápidas a los microorganismos y que reaccionan básicamente de la misma manera a infecciones repetidas y los componentes principales de la inmunidad innata son⁵⁵:

- Barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales.
- Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células citocidas naturales (NK, del inglés natural killer).
- Proteínas sanguíneas entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.
- Proteínas denominadas citoquinas, que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular.

Los mecanismos de inmunidad innata son estimulados por estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados y pueden no distinguir

diferencias sutiles entre las sustancias extrañas. La inmunidad innata representa la primera línea defensiva contra los microorganismos. La patogenicidad de los microorganismos está relacionada en parte con su capacidad para resistir a los mecanismos de la inmunidad innata⁵⁶.

2.2.10.2. Barreras epiteliales: Las superficies epiteliales y su estado integro en conjunto forman una barrera física que separan el medio del huésped. Existen tres importantes interfaces, que son: la piel, el epitelio respiratorio y el epitelio digestivo. Estos epitelios además de constituir una capa protectora, poseen otras características que lo hace inmunológicamente importante, tales como: la síntesis de péptidos antibióticos, subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales y células dendríticas⁵³.

Péptidos antibióticos: La piel tiene la capacidad de sintetizar y secretar proteínas con capacidad antibiótica y antimicótica denominados “Defensinas”, de 29-34 aminoácidos, que aumentan sus concentraciones en presencia de IL1 y TNF, ambos secretados por los macrófagos activos. El epitelio intestinal también produce una proteína con potentes efectos antimicrobianos denominada “Criptocidinas”⁵⁴.

Linfocitos T intraepiteliales: Son una subespecie de linfocitos T y por lo tanto debería ser considerado como parte de la inmunidad adaptativa. Pero, este linfocito T, presenta una limitada diversidad de receptor antigénico, además las cadenas del TCR (receptor de las células T) no son $\alpha\beta$ (como el resto de los linfocitos T), si no $\gamma\delta$. Otra diferencia de gran importancia es el hecho de que estos Linfocitos T intraepiteliales no reconocen al MHC si no a una proteína similar al MHC, denominada CD1. Debido a estas notables desigualdades se considera al Linfocito T intraepitelial como parte de la inmunidad Innata⁵⁷. Una vez activado, el linfocito T intraepitelial, secreta una variada gama de citoquinas proinflamatorias como: IL1, TNF, Linfotaxinas e INF γ . Además poseen una actividad citolítica mediada por “Perforinas” la que lleva a la célula a la pérdida de la homeostasia intracelular y la muerte.

Linfocitos B-1: Son células presentes en el epitelio de la cavidad peritoneal y que también deberían ser considerados como integrantes de la inmunidad adaptativa, pero su receptor antigénico, posee baja diversidad y su estructura es similar a la del receptor del linfocito T intraepitelial⁵⁸. Debido a

estas características se considera al linfocito B-1, como parte de la inmunidad innata. Las células B-1 secretan permanentemente IgM específica para antígenos compartidos por una amplia variedad de bacterias, tales como la “Fosforilcolina” y el “Lipopolisacarido o LPS”⁵⁹.

2.2.10.3. Células efectoras Neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares: son las células blancas más abundantes en la sangre, correspondiendo entre un 50 y 60% del total de leucocitos. Los neutrófilos alcanzan el sitio de la infección en pocas horas y son los responsables de la primera “oleada” de células encargadas de la respuesta del huésped. Si estos no es “reclutado” en un tiempo no mayor a 6 horas, estos experimentan la apoptosis. Los Neutrófilos presentan en su interior gránulos cuyo contenido es rico en Lisozima, Colagenasa y Elastasa⁵⁴.

Monocitos/Macrófagos: los monocitos son células maduras precursoras de los macrófagos, es decir, una vez que el monocito es activado este experimenta cambios morfológicos que lo adaptan para sus nuevas funciones como macrófagos. Los macrófagos son células de mayor tamaño y capacidad fagocítica que los neutrófilos, además poseen la capacidad de unirse a otros macrófagos y así originar las “células gigantes”, con una capacidad fagocítica aún mayor⁶⁰. Los macrófagos constituyen la segunda “oleada” de células que acuden al sitio de la infección. Existen, además de los monocitos y macrófagos circulantes, otros macrófagos que se encuentran como células residentes de cada tejido, por ejemplo: en el hígado existen las células de Kupffer, en el SNC encontramos a la microglía y en los alvéolos pulmonares a los macrófagos alveolares^{61,62}.

Células NK: son un tipo de linfocitos, que participan en la inmunidad frente a virus y a microorganismos intracelulares. Este tipo celular posee moléculas que reconocen al MHC I, de esta manera si una célula expresa péptidos antigénicos en su membrana unida a las moléculas del MHC I, las células NK las reconocerán y serán activadas. Otro mecanismo, consiste en la activación de las NK⁶³.

Además de estos dos mecanismos, las células NK, participan de un sistema conocido como “Citotoxicidad mediada por anticuerpos”, que consiste en la activación de las NK frente a partículas que se encuentren recubiertas con

anticuerpos, esto se lleva adelante mediante un receptor que poseen las NK. Las funciones efectoras de las NK son, la destrucción de las células infectadas y la activación de macrófagos. Las funciones líticas de las NK, son llevadas a cabo mediante dos proteínas citoplasmáticas, denominadas, “perforinas” y “granzimas”. Las perforinas, crean un poro en la membrana de la célula blanco, mientras que las granzimas ingresan por este poro e inducen la apoptosis⁵⁴.

2.2.10.4. eínas efectoras

Sistema del complemento: este es un grupo de proteínas plasmáticas, cuyas principales funciones son: La inflamación, opsonización de microorganismos y lisis bacteriana. El reconocimiento del microorganismo y la activación del sistema del complemento, se realiza a través de tres posibles rutas: La *vía clásica*, capaz de reconocer a los microorganismos recubiertos de anticuerpos. La *vía alterna*, capaz de reconocer a estructuras propias de las bacterias. Y la *vía de las lectinas*, que puede reconocer a una proteína plasmática denominada: “Lectina de unión a manosa”, que reconoce los residuos de manosa en las glicoproteínas y glucolípidos de la membrana de la bacterias, a los cuales se adhiere y de esta manera puede ser reconocida por el complemento^{53,65}.

Proteína C reactiva: pertenece a un grupo de proteínas denominadas: “proteínas de la fase aguda”, porque sus niveles plasmáticos aumentan considerablemente durante los estados infecciosos agudos. Esta es una proteína capaz de unirse a los fosfolípidos de las cápsulas bacterianas, actuando como opsonina. Además posee la capacidad de activar al complemento por la vía clásica⁶⁵.

2.2.11. Inmunidad adaptativa.- En contraposición con la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición a agentes infecciosos, cuya intensidad y capacidad defensiva aumentan después de cada exposición subsiguiente a un determinado microorganismo. Debido a que esta forma de inmunidad se desarrolla como una respuesta a la infección, recibe el nombre de inmunidad adaptativa⁵⁴. Las características definitorias de la inmunidad adaptativa son

una especificidad extraordinaria para macromoléculas diferentes y su capacidad para “recordar” y responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo. Debido a esta capacidad para discriminar entre diferentes microorganismos y macromoléculas, aunque estén estrechamente relacionados, la inmunidad adaptativa se denomina también **inmunidad específica**: en ocasiones, también recibe el nombre de inmunidad adquirida para resaltar el hecho de que se basa en respuestas protectoras potentes “adquiridas” con la experiencia⁵³.

Los componentes de la inmunidad específica son los linfocitos y sus productos. Las sustancias extrañas que inducen respuestas inmunitarias específicas o son dianas de tales respuestas se denominan antígenos.

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, **la inmunidad humoral y la inmunidad celular**, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos⁶⁴.

En la **inmunidad humoral**, participan moléculas presentes en la sangre denominadas anticuerpos, que son producidas por los linfocitos B. Los anticuerpos reconocen específicamente a antígenos microbianos, neutralizan la infectividad de los microorganismos y dirigen su acción a los microorganismos para su eliminación por medio de diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microorganismos y toxinas para facilitar su eliminación. Los anticuerpos son elementos especializados, de manera que tipos diferentes de anticuerpos pueden activar mecanismos efectores distintos. Por ejemplo algunos anticuerpos inducen la fagocitosis, mientras que otros desencadenan la liberación de mediadores inflamatorios por leucocitos tales como los mastocitos⁵³.

En la **inmunidad celular**, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, como los virus y bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tiene acceso los

anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas⁵⁴.

Las características principales de las respuestas inmunitarias adaptativas son: especificidad, diversidad, memoria, especialización, autolimitación y ausencia de autorreactividad⁵³.

Especificidad: garantiza que microorganismos distintos estimulen respuestas específicas.

Diversidad: permite al sistema inmunitario responder a una gran variedad de microorganismos.

Memoria: da lugar a respuestas aumentadas a exposiciones repetidas al mismo microorganismo.

Especialización: genera respuestas óptimas para la defensa frente a diferentes tipos de microorganismos.

Autolimitación: permite al sistema inmunitario responder a microorganismos encontrados por primera vez.

Ausencia de autorreactividad: impide la producción de lesiones del huésped durante las respuestas a los microorganismos.

Las células principales del sistema inmunitario son los linfocitos, las células accesorias y las células efectoras. Los linfocitos son las células que reconocen y responden específicamente frente a antígenos extraños y, por tanto, son los elementos mediadores de la inmunidad humoral y celular. Existen distintas subpoblaciones de linfocitos que se diferencian en su mecanismo de reconocimiento de los antígenos y sus funciones efectoras.

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Reconocen antígenos extracelulares y antígenos de la superficie celular y se diferencian en células secretoras de anticuerpos, actuando como mediadores de la inmunidad humoral⁵⁴.

Los linfocitos T, células de la inmunidad celular, no producen anticuerpos y se subdividen en células T colaboradoras y las células T citolíticas, sus receptores de antígenos son moléculas de la membrana distintas de los anticuerpos pero estructuralmente relacionado con ellos. Así mismo ambos tienen una especificidad limitada para los antígenos, solo reconocen

antígenos peptídicos unidos a proteínas del huésped codificadas por genes del MHC y que se expresan en la superficie de otras células⁶⁴.

Una tercera clase de linfocitos, las células citocidas naturales (NK) interviene en la inmunidad innata frente a virus y otros microorganismos intracelulares.

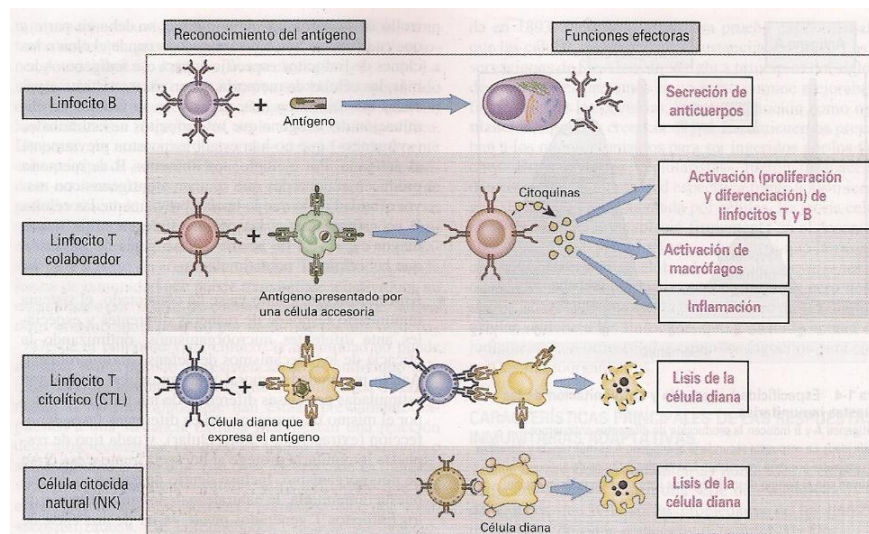


Figura 6: Clases de linfocitos. Reconocimiento del antígeno y funciones efectoras

Fuente: Abbas, A. Inmunología celular y molecular, 2002.

2.2.12. Inmunomodulación

Es el cambio en el sistema inmunitario causado por sustancias que activan o debilitan su función⁶⁴. La modulación del sistema inmune incluye inducción, expresión, amplificación o inhibición de las fases aferentes, centrales o eferentes de la respuesta inmune⁵². Se han identificado varios tipos de inmunomoduladores, entre ellos INF γ , factor estimulante de la colonia de granulocitos, factor estimulante de la colonia de granulocitos, monocitos y sustancias purificadas de microorganismos.

En recientes décadas, polisacáridos aislados de hongos, algas, líquenes y plantas superiores exhiben un gran número de propiedades terapéuticas, modulando el sistema innato y adquirido debido a sus propiedades terapéuticas y su baja toxicidad⁶⁵. Se han realizado varios estudios evaluando la actividad inmunomoduladora de plantas medicinales. Classen et al. (2006)⁶⁶, evaluaron los efectos inmunomoduladores de proteínas arabinogalactánicas de *Baptisia* y *Echinacea*, observando una estimulación

sobre los macrófagos y activación de linfocitos B. Rininger et al. (2000)⁶², evaluaron la actividad inmunoestimuladora, antiinflamatoria y antioxidante de *Echinacea* en macrófagos murinos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), reportando una estimulación del sistema inmune innato con la activación de macrófagos y aumentando la viabilidad de las PBMC. Castillo (2003)⁶³, evaluó la actividad moduladora sobre el complemento de cinco plantas, de las cuales *Dorstenia contrajerva*, *Phlebodium aureum* y *Simarouba glauca* presentaron actividad inhibitoria sobre la vía clásica del complemento. Alvarez (2006)⁶⁴, evaluó la actividad inmunomoduladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum* obteniendo actividad inhibitoria de ambos extractos sobre la vía clásica del complemento y linfoproliferación *in vitro*.

Asimismo, se destaca⁶⁵ que el extracto de *Silybum marianum* induce un aumento de la proliferación de linfocitos murinos *in vitro*, junto con un incremento de interferón gamma, IL-4 e IL-10 en los timocitos.

Amir Jhofran et al. (2000)²¹ evaluó el efecto inmunomodulador *in vitro*, sobre linfocitos de sangre periférica y timocitos, de los extractos etanólicos de cinco plantas: *Silybum marianum*, *Matricaria chamomilla*, *Calundula officinalis*, *Cichorium intybus* y *Dracocephalum kotschy*. Los resultados obtenidos muestran, que ninguno de los extractos presenta un efecto mitogénico directo, excepto *Silybum marianum* (100 ug/mL) que muestra un 13 % de incremento de la proliferación de linfocitos a una concentración de 50 ug/mL. En cultivos extralinfocitarios se observa un marcado efecto mitogénico con bajas concentraciones de todos los extractos excepto *Dracocephalum*, destacando los linfocitos tratados con 0.1 – 10 ug/mL de *Calundula officinalis* y 10 ug/mL de *Matricaria chamomilla* y *Cichorium intybus*, que presentan un fuerte incremento en la proliferación celular²². Los polisacáridos obtenidos de la fracción soluble en agua de distintas plantas como *Plantago lanceolata*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* y *Rudbeckia fulgida* fueron analizados *in vitro* para conocer la actividad mitogénica en timocitos de ratas y ratones, observándose una respuesta mitogénica dosis dependiente²³.

2.3. Marco conceptual

En el estudio de plantas medicinales, un momento de gran importancia que puede definir el curso de la investigación y su impacto desde todos los puntos de vista, lo constituye el criterio empleado para la selección de las especies a estudiar. Aunque obvio y cotidiano; realmente muchos trabajos en este campo adolecen de una perspectiva coherente en este sentido, que puede ser el motivo de resultados negativos o la réplica inconsciente de investigaciones, lo cual cuando menos hace perder tiempo, recursos y el entusiasmo del personal, porque no se alcanza la novedad esperada en los resultados⁶⁷. Cuando se conocen en detalle los posibles criterios de selección de las plantas a investigar y las ventajas y amenazas en cada caso; además del contexto teórico científico-técnico de las disciplinas involucradas en este campo (Química, Farmacología, Toxicología), entonces las posibilidades de éxito del proyecto serán mucho mayores.

Nuestro estudio se ubica dentro de la fitoquímica y la farmacología, en este contexto hacemos nuestra una metodología adecuada al objetivo de estudio que perseguimos y se usa a lo largo del trabajo un conjunto de conceptos básicos que revisamos a continuación.

Plantas medicinales: Según la OMS, es aquella que en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica⁶⁸.

Droga: La OMS define como la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica. La Real Farmacopea Española establece que “*se consideran drogas vegetales las plantas, partes de plantas, algas, hongos o líquenes, enteros, fragmentados o cortados, sin procesar, generalmente desecados, aunque también a veces en estado fresco. También se consideran drogas vegetales ciertos exudados que no han sido sometidos a un tratamiento específico*”⁶⁸.

Principios activos: son las sustancias responsables de la acción farmacológica.

Fitoterapia: es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico⁶⁷.

La **Recolección:** de ella depende en gran medida la calidad del producto obtenido. La elección del momento adecuado para realizar la recolección de una planta medicinal debe estar apoyada en un estudio analítico previo de su composición química, lo que permite predecir variaciones diarias, estacionales y de desarrollo⁶⁸.

Una vez recolectada la planta, es fundamental comenzar por **definir su identidad** mediante el estudio de sus características morfológicas (macroscópicas y microscópicas). El estudio microscópico tiene una gran importancia práctica en el campo de la Farmacognosia, puesto que nos permite resolver ciertos problemas que se plantean con frecuencia en el ámbito profesional, tanto desde el punto de vista de la identificación de las drogas, como por la posibilidad de detectar posibles falsificaciones o adulteraciones, que en numerosas ocasiones se producen con fines fraudulentos⁶⁸.

Es importante mantener las plantas medicinales o las drogas en **condiciones óptimas de conservación y almacenamiento**, evitando así que se produzca un deterioro en su calidad.

Mediante la realización de **ensayos fisicoquímicos cualitativos** podemos determinar la presencia de determinados principios activos sobre la droga entera o pulverizada, o más frecuentemente, sobre extractos obtenidos por diferentes procedimientos de extracción a partir de la planta y con diferentes disolventes⁶⁸. Estos métodos comprenden:

Reacciones de identificación (de coloración, de precipitación, de fluorescencia, microsublimación), que permiten detectar determinados constituyentes o sustancias químicas características de una planta (flavonoides, alcaloides, taninos, triterpenos, lactonas).

Análisis cromatográfico, que permite separar los diferentes componentes químicos de una especie determinada.

La estandarización y la valoración de ciertas drogas se realizan sobre la base de su efecto en seres vivos, a través de los denominados **ensayos biológicos** o bioensayos⁶⁸.

Inflamación: es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es normalmente una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o, incluso cáncer^{11,29}.

Antiinflamatorios no esteroideos: son un grupo químicamente heterogéneo de sustancias, que inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa resultando en la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. La inhibición de esta enzima es la responsable de sus efectos terapéuticos y efectos adversos¹¹.

Antiinflamatorios esteroideos: Son hormonas producidas por la corteza adrenal o semisintéticos. Los corticoesteroides (cortisona) son hormonas que tienen propiedades antiinflamatorias e inmunoreguladoras. Normalmente, se producen en pequeñas cantidades en las glándulas suprarrenales de nuestro cuerpo. Los glucocorticoides actúan a un nivel superior donde actúan los AINES, estimulan una proteína, la lipocortina, la cual inhibe a la fosfolipasa A₂ por lo tanto inhibe la síntesis de ácido araquidónico y de todos los derivados de este, tanto prostaglandinas, prostaciclina como leucotrienos. Son inhibidores más inespecíficos en esta cascada¹¹.

Radicales libres: átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado, muy reactivos, de vida muy corta y que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica³⁷.

Antioxidantes: conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales u oxidantes como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando sus funciones vitales⁴⁵.

Inmunidad: conjunto de mecanismos de defensa que le permiten a un organismo protegerse de los microorganismos que encuentra en su medio ambiente, evitar el desarrollo de células tumorales y eliminar moléculas nocivas originadas en su interior como consecuencia del envejecimiento, infecciones, traumatismo o crecimiento neoplásico⁵².

Respuesta inmune: la función del sistema inmune es distinguir lo propio de lo extraño y proteger el organismo de esto último⁵². La respuesta inmune está estructurada por una secuencia compleja de eventos; se inicia con la eliminación del agente que la provoca. Esta respuesta depende principalmente de tres tipos celulares: macrófagos, linfocitos T y linfocitos B. aparte de eso, el sistema inmunitario está conectado de manera integral con el complemento, cininas, coagulación, y sistemas fibrinolíticos, todos los cuales participan en la inflamación. Hay dos niveles de defensa contra la invasión por los agentes externos: la inmunidad innata y la adaptativa o adquirida⁵⁵.

Inmunomodulación: es el cambio en el sistema inmunitario causado por sustancias que activan o debilitan su función. La modulación del sistema inmune incluye inducción, expresión, amplificación o inhibición de las fases aferentes, centrales o eferentes de la respuesta inmune⁵².

Isoprinosine: Cuyo principio activo es el metisoprinol, posee un doble mecanismo de acción que permite una pronta y vigorosa respuesta del sistema inmune¹¹.

Acción inmunológica: El incremento en la respuesta de la tercera barrera natural del organismo (sistema inmune) contra los antígenos virales infectantes se produce por: estimulación a la producción linfocitos T, aumento de la función de linfocitos T asesinos. Apoyo a la función de las células asesinas naturales. Incremento de la actividad de linfocitos B y con ello la producción de inmunoglobulinas. Intensificación de la actividad fagocitaria, produciéndose de hecho un fortalecimiento de la respuesta inmune a nivel celular y humoral¹².

Prednisona: Es uno de los corticoides más utilizados en la clínica. Se trata de un fármaco activo por vía oral que se metaboliza en el hígado a prednisolona, la forma activa. En comparación con la cortisona, la prednisona es unas cuatro veces más potente y muestra una duración de su acción intermedia entre la de la hidrocortisona y la dexametasona. La prednisona se utiliza en numerosas condiciones inflamatorias y alérgicas. Al tener sólo una pequeña actividad mineralcorticoide, no se utiliza para tratamiento de la insuficiencia adrenal a menos de utilizar concomitantemente un mineralcorticoide¹².

Mecanismo de acción: Los glucocorticoides son hormonas naturales que previenen o inhiben la inflamación y las respuestas inmunológicas cuando se administran en dosis terapéuticas. Los glucocorticoides atraviesan con facilidad la membrana celular y se unen con alta afinidad a receptores citoplasmáticos. La activación de estos receptores induce la transcripción y la síntesis de proteínas específicas. Algunas de las acciones mediadas por los glucocorticoides son la inhibición de la infiltración de leucocitos en los lugares inflamados, la interferencia con los mediadores de la inflamación, y la supresión de las respuestas humores. Las respuestas antiinflamatorias se deben a la producción de lipocortinas, unas proteínas inhibidoras de la fosfolipasa A₂, enzima implicada en la liberación del ácido araquidónico, intermediario de la síntesis de mediadores de la inflamación como las prostaglandinas o los leucotrienos. En consecuencia, los glucocorticoides reducen la inflamación y producen una respuesta inmunosupresora¹².

2.4. Formulación de la Hipótesis y variables

2.4.1. Hipótesis:

El extracto clorofórmico de las hojas del *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, tiene actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora.

2.4.2. Variables:

Variable Independiente

Metabolitos secundarios presentes en el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Indicadores:

- Concentración del extracto: 100, 200 y 300 mg/kg

Variable Dependiente

Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Indicadores:

- Inflamación, recuento de glóbulos blancos, rojos, índice fagocítico, actividad antioxidante.

III. METODOLOGÍA

3.1.- Tipo de estudio

El presente estudio corresponde a una investigación experimental.

3.2. Muestra

3.2.1. Identificación

La clasificación sistemática fue estudiada según el sistema de clasificación de Cronquist (1981), el que se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 1).

3.2.2. Colecta de la especie

La *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” se colectó en el distrito de Vinchos – Huamanga – Ayacucho a una altitud de 3900 msnm, en el mes de marzo del 2012. Posteriormente 5 kg de hojas en buen estado fueron colocados en bolsas de papel y trasladados al laboratorio del Instituto de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su desecación (Anexo 2).

3.3. Conservación de animales de laboratorio

Se empleó ratas machos (*Rattus norvegicus*) cepa Holtzman de 200 a 250 g de peso y ratones (*Mus musculus*) entre 18 – 25 g de peso, todos en buen estado de salud, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud – Chorrillos, los que fueron alojados y aclimatados en jaulas individuales una semana antes de los experimentos en el Bioterio del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana con libre acceso a su alimentación y al agua, a una temperatura ambiental entre 23 a 26 °C y una humedad relativa de 60 a 70 % con 12 horas de luz y oscuridad.

3.4.- Procedimientos

3.4.1. Obtención del Extracto Clorofórmico

Un kg de hojas secas y molidas en un molino de cuchillas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” fueron desengrasadas con éter de petróleo y maceradas con 2.5 L de cloroformo durante siete días con agitación diaria, se repitió el proceso por dos veces. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio (rotavapor) para obtener el extracto clorofórmico, en el que se realizó los ensayos químicos (solubilidad, marcha fitoquímica, ensayos cromatográficos, determinaciones espectrales), y biológicos (toxicidad y las actividades antiinflamatoria, antioxidante e Inmunomoduladora), así mismo el extracto se conservó en un frasco ámbar tapado herméticamente en refrigeración (Anexo 3 y 12).

3.4.2. Estudios químicos⁶⁹ (Anexo 13)

3.4.2.1. Determinación de la prueba de solubilidad

Se realizó en solventes de diferente polaridad: n-Hexano, Éter Etílico, Cloroformo, Diclorometano, Acetato de Etilo, Acetona, Butanol, Etanol, Metanol y Agua. Para el ensayo se pesó 10 mg de extracto al que se le agregó 1 mL de solvente.

3.4.2.2. Marcha fitoquímica

Se pesó 100 mg de extracto clorofórmico total y se realizó las reacciones de identificación de metabolitos secundarios, mediante las técnicas de (Miranda, et al.,1992; Lock de Ugaz,1994)^{70,71}, para reconocer los metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante las siguientes reacciones:

Azucares:

Reacción de Molish: a 1 mL de extracto se añadió gotas de reactivo alfa naftol al 1% mezclar bien, luego dejó caer por las paredes del tubo 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado, la formación de un anillo coloreado indica presencia de carbohidratos⁷².

Reacción de Benedict: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de reactivo de benedict hervir por 3 minutos y luego agregar 1 mL del extracto mezclar y

volver a calentar a ebullición, un precipitado rojo indica presencia de carbohidratos reductores.

Alcaloides:

Dragendorff: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color naranja marrón es positivo.

Mayer: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color blanco crema es positivo.

Popof: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color amarillo es positivo⁷³.

Taninos:

Gelatina: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de gelatina al 1%, un precipitado de color blanco denso es positivo.

Agua de Bromo: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución agua de bromo, un precipitado de color blanco denso es positivo⁷³.

Aminoácidos libres:

Ninhidrina: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo al 0.1%, un color violáceo es positivo para aminoácidos libres y grupos amino, si la reacción es negativa calentar.

Flavonoides:

Shinoda: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó mg de Mg metálico más gotas de HCl concentrado, un color rojo es positivo para flavonoides, chalconas, auronas⁷³.

Compuestos fenólicos:

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de FeCl_3 al 1%, un color verde o azul es positivo⁷³.

Saponinas:

Ensayo de espuma: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó 8 mL de agua destilada, agitar fuertemente, la producción de espuma por 15 minutos de 0.5 a 1 cm. es positivo para saponinas

Triterpenos y esteroides:

Lieberman-Burchart: en un tubo de ensayo se colocó 100 mg del extracto se disuelve en 2 mL de cloroformo y se le añadió gotas del reactivo, un color verde, azul o naranja es positivo para triterpenos y esteroides⁷³.

Lactonas:

Bajlet: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, una coloración naranja es positivo.

Antronas y naftoquinonas:

Borntrager: en un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo, un precipitado de color rojo es positivo⁷³.

3.4.2.3. Cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico total

Se empleó el extracto clorofórmico total, placas cromatográficas en capa fina unidimensional ascendente de 20 x 20 cm; con fase estacionaria Sílica Gel G-60 y fase móvil diclorometano y metanol en proporciones de 4:1. Se realizó cinco siembras de diez repeticiones cada una. Para el revelado se utilizaron los reactivos específicos, luz UV, vapores de amoníaco. Los metabolitos secundarios encontrados fueron separados (por raspado) para su empleo en la cromatografía en capa fina a escala preparativa (Anexo 5).

3.4.2.4. Cromatografía en capa fina a escala preparativa

Se realizó para aislar, purificar y elucidar la estructura química de los flavonoides y se emplearon placas cromatográficas de 20 x 20 cm, como fase estacionaria Sílica Gel G-60 y fase móvil el sistema de solventes constituido por cloroformo – metanol en la proporción de 4:1; después de realizar el ensayo los resultados del cromatograma fueron observados en la luz UV y luego separados (por raspado) y disueltos con metanol absoluto, luego se filtró y las alícuotas obtenidas se emplearon en la elucidación estructural mediante Espectroscopia UV-Visible.

3.4.2.5. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV

Después de separar las manchas de las placas cromatográficas a escala preparativa se procedió a extraer con metanol absoluto del polvo de sílica gel G-60. Se obtuvieron 12 fracciones de las cuales las fracciones 1, 4, 5, 6, 9,

10, 11 y 12, no presentaron fluorescencia al UV y las fracciones 2, 3, 7 y 8 presentaron fluorescencia frente al UV a 366 nm. Para confirmar la pureza de las fracciones, todas se llevaron al análisis espectrofotométrico del UV descartándose 8 fracciones, finalmente al analizar los espectros UV de las fracciones 2, 3, 7 y 8 y compararlos sus longitudes de onda de los picos de cada fracción con una tabla de referencia⁷², nos permitió elucidar las estructuras propuestas³.

3.5. Ensayos Biológicos

3.5.1. *icidada aguda oral a dosis única*

Se aplicó el Test N° 423, método clásico de la OECD, descrito en la normativa N° 423 de la OECD⁷⁴.

En el ensayo se emplearon 12 Ratones Balb/c de 20 a 25 g de peso, se formaron 3 grupos de 4 ratones cada uno, conformado por machos y hembras y se procedió de la siguiente manera: Al grupo control (dos machos y dos hembras), se les administró por vía oral agua destilada 0.2 mL, al grupo I (machos) y grupo II (hembras), se les administró por vía oral el extracto de prueba a la dosis única de 2000 mg/Kg de peso corporal. Concluida la administración los ratones fueron observados a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 12 horas, después todos los días hasta los 14 días; asimismo se controló el peso corporal todos los días y se registró la aparición y duración de cualquier síntoma tóxico. Concluido el experimento se sacrificaron los ratones, se realizó la autopsia para el examen macroscópico de órganos importantes como corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, estómago y cerebro. El estudio histológico se realizó en el laboratorio de patología del hospital Arzobispo Loayza, no encontrándose alteraciones histológicas en los órganos estudiados.

3.5.2. *vidada antioxidante in vitro*^{37,75}

Se empleó el bioensayo *in vitro* donde el radical 1,1-difenil-2-picril hidrazilo hidratado (DPPH), en solución alcohólica (butanólica) es de color violeta intenso, al ser capturado por otras sustancias (antioxidantes) pierde su color característico el mismo que es medido por espectrofotómetro.

Para el ensayo se utilizó una solución butanólica de DPPH a una concentración de 20 mg/L, cuatro soluciones butanólicas del extracto a concentraciones de 900, 600, 300 y 150 ug/mL y un blanco con butanol para ajustar el espectrofotómetro a cero y se procedió a la lectura de la absorbancia a 517 nm⁷⁶.

El cálculo de la capacidad de decoloración (capacidad antioxidante) se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Cap. Antiox.} = 1 - \left[\frac{A_2 - A_3}{A_1} \right] \times 100$$

A1: Absorbancia del patrón de referencia

A2: Absorbancia de la muestra

A3: Absorbancia del blanco de la muestra

3.5.3. *vidad antioxidante in vivo*

En este ensayo se midió la actividad de los marcadores biológicos como la Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y el Malondialdehído (MDA)³⁷. Para el ensayo se emplearon ratas machos de 200 a 250 g de peso, luego fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de 7 ratas cada uno, a los cuales se les administró el siguiente tratamiento por vía oral por 5 días:

Grupo I: Control.- 1 ml H₂O destilada por vía oral

Grupo II: Tratamiento 1.- Extracto 100 mg/Kg de peso corporal por día.

Grupo III: Tratamiento 2.- Extracto 200 mg/Kg de peso corporal por día.

Grupo IV: Tratamiento 3.- Extracto 300 mg/Kg de peso corporal por día.

Al sexto día se anestesiaron las ratas con éter etílico y luego se procedió a extraer sangre por punción cardiaca e inmediatamente se procedió a realizar la hemólisis de la siguiente manera: Se midió 100 uL de sangre venosa y se completó con agua bidestilada a 1 mL, luego de esta dilución se volvió a medir 100 uL y se diluyó hasta 5 mL con agua bidestilada, se reposó por 30 minutos para la hemólisis completa, constituyendo al mismo tiempo la solución de trabajo (MP)³⁷.

3.5.3.1. Determinación de la Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). EC: 1.15.1.1. Método de MARKLUND y MARKLUND⁷⁷

Se midió 870 μ L de buffer Tris. HCl, con EDTA 50 mM y pH = 8.2, se adicionó 100 μ L de MP, se llevo al baño maría por un minuto y se agregó 30 μ L de pirogalol y se midió su cinética en el espectrofotómetro UV-Visible a un longitud de onda de 420 nm. En estas condiciones las muestras obtenidas reaccionan con pirogalol, este se autoxida y da como producto final pirogalina, un compuesto amarillo y un radical superóxido que autocataliza la oxidación del pirogalol. La cinética de aparición del producto de la autoxidación del compuesto se registró durante 3 minutos. Luego se calculó el porcentaje de inhibición de la autoxidación y se considera que una unidad de actividad enzimática logra una inhibición de 50 %. La unidad en que se expresa la actividad es unidades internacionales (UI SOD/mL sangre).

3.5.3.2. Determinación de la Actividad de la enzima Catalasa (CAT).

EC: 1.11.1.6. Método según AEBI⁷⁷:

La descomposición enzimática del H_2O_2 puede ser medida directamente por decrecimiento de la absorbancia a 240 nm. La actividad de la enzima se determinó midiendo el consumo de H_2O_2 . Se procedió de la siguiente manera: A la muestra problema obtenida en la hemólisis se realizó una dilución de 1/2000, con buffer fosfato 50 mM, pH = 7.0, luego de estas diluciones se tomaron 600 μ L de MP y 300 μ L de H_2O_2 30 mM. La cinética de descomposición del H_2O_2 se registró en el espectrofotómetro UV-Visible por 1.30 minutos

Una unidad es definida como la cantidad de enzima que puede descomponer un μ mol de H_2O_2 por minuto a 25 °C a un pH = 7. Los resultados se expresan U CAT/mL sangre.

3.5.3.3. Determinación de la peroxidación lipídica (MDA)⁷⁷: Este ensayo se basa en la reacción de un reactivo cromogénico, el ácido 2- tiobarbitúrico, con MDA a 25 °C. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico a través de una condensación de tipo Knoevenagel, para producir un cromóforo con la máxima absorbancia a 532 nm. Se procedió de la siguiente manera: se midió 0.3 mL de MP se adicionó 0.6 mL

de TCA al 20 %, hervir por 15 minutos, luego enfriar y agregar 0.9 mL de TBA, hervir por 30 minutos, luego enfriar en un baño de hielo, se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos, luego se separó el sobrenadante y se hizo la lectura en el espectrofotómetro a 535 nm.

3.6. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria fue evaluada mediante el modelo biológico de edema de pata inducido por la carragenina descrito por Winter y posteriormente modificada por (Arroyo et al., 2012)⁸, empleando como estándar ibuprofeno 120 mg/kg y prednisona 1.2 mg/kg.

Para el ensayo se emplearon 42 ratas machos de 200 a 250 g de peso, fueron sometidos a ayuno 12 horas antes de iniciar el ensayo con libre acceso de agua y finalmente fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos de 7 ratas cada uno.

Inicialmente se midió el diámetro plantar basal de la pata trasera derecha (Vo) de todos los animales mediante un calibrador (mm). A continuación se administra por vía oral mediante sonda esofágica de la siguiente manera:

Grupo I: Control.- Solución de CMC a 130 mg %.

Grupo II: Estándar 1.- Ibuprofeno 120 mg /Kg de peso corporal.

Grupo III: Estándar 2.- Prednisona 1.2 mg/Kg de peso corporal.

Grupo IV: Tratamiento 1.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” 100 mg/kg de peso corporal.

Grupo V: Tratamiento 2.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” 200 mg/kg de peso corporal.

Grupo VI: Tratamiento 3.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” 300 mg/kg de peso corporal.

Transcurrido 30 minutos se procedió a producir la inflamación inyectando una suspensión de lammda carragenina al 1 % en suero fisiológico en un volumen de 0.1 mL en la aponeurosis subplantar de la pata trasera derecha. La medida de la evolución del edema se realiza a las 0.5, 1, 2, 3, 5 y 7 horas después de la administración de carragenina mediante la medición del diámetro de la pata; luego se determinó el incremento del diámetro para cada rata. Los datos de los lotes se expresan como los promedios y la media

del error estándar; y la significancia estadística se determinó mediante la *t*-Student.

Para calcular el % de inhibición de la inflamación se calculó la media de los incrementos de volumen de cada lote para cada tiempo y se aplicó la fórmula siguiente:

$$EAI = \frac{(D/D_0 - d/d_0)}{D/D_0} \times 100$$

EAI: Eficiencia antiinflamatoria

D/D₀: Incremento diámetro del blanco, referido al diámetro inicial (D₀)

d/d₀: Incremento diámetro inflamado tratado con un agente antiinflamatorio, referido al diámetro inicial (d₀).

3.7. Actividad Antiinflamatoria en procesos crónicos

Se empleó el método de Sedwick (Arroyo et al., 2012)⁸, para el ensayo se emplearon 42 ratas machos de 200 a 250 g de peso, fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos de 7 ratas cada uno a los cuales se les rasuró el lomo un área de aproximadamente 3cm de largo por 2 cm de ancho y 24 horas después se les inyectó vía subcutánea 20 mL de aire en el área intracapsular del lomo formándose una bolsa de aire de forma oval que se conservó por reinflación con 10 mL de aire a los 3 y 6 días respectivamente. El séptimo día los animales fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo I: Control.- Solución de CMC a 130 mg %

Grupo II: Estándar 1.- Ibuprofeno a 120 mg /Kg de peso corporal.

Grupo III: Estándar 2.- Prednisona a 1.2 mg/Kg de peso corporal.

Grupo IV: Tratamiento 1.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" 100 mg/kg de peso corporal.

Grupo V: Tratamiento 2.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" 200 mg/kg de peso corporal.

Grupo VI: Tratamiento 3.- Extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" 300 mg/kg de peso corporal.

Tres horas después se inyectó directamente a la bolsa de aire 2 mL de suspensión de λ carragenina al 1 % en suero fisiológico, luego de seis horas fueron sacrificados con una dosis letal de fenobarbital.

Seguidamente se inyectó a la bolsa de aire 5 mL de suero fisiológico con EDTA al 0.1 % y luego se realizó una incisión en la bolsa de aire y se procedió a extraer el exudado con una jeringa estéril de tuberculina en el cual se determinó proteínas totales, albumina y MDA.

Finalmente se extrajo con un bisturí un área de la bolsa de aire, el cual se lavó con suero fisiológico y se conservó por 7 días en solución de formol al 10 % tamponado con fosfato disódico/monosódico.

Para el estudio histopatológico se llevó al laboratorio de Patología del Hospital Arzobispo Loayza.

3.8. Actividad Inmunomoduladora

Se empleó el método de velocidad de aclaramiento de la tinta china, Arroyo et al. (2004)⁹, se emplearon 42 ratas machos con un peso de 200 a 250 g, para el experimento se procedió de la siguiente manera:

1.- Se formó 6 grupos de 7 ratas cada uno al azar y se extrajo sangre venosa por punción cardíaca, para determinar la fórmula leucocitaria.

2.- Seguidamente se administró a cada grupo lo siguiente:

Grupo I: Control.- Suero fisiológico 5 ml/kg vía oral por 5 días

Grupo II: Inmunoestimulante.- Isoprinosine 300 mg/kg vía oral por 5 días

Grupo III: Inmunosupresor.- Prednisona 60 mg/kg vía oral por 5 días

Grupo IV: Extracto 100 mg/kg vía oral por 5 días

Grupo V: Extracto 200 mg/kg vía oral por 5 días

Grupo VI: Extracto 300 mg/kg vía oral por 5 días

4.- Pasado las 24 horas se administró a cada uno de los miembros de todos los grupos 0.5 ml de tinta china 10% vía endovenosa en suero fisiológico, empleando la vena sagital de la cola.

5.- Luego se extrajo sangre venosa por punción cardíaca a cada una de las unidades experimentales y en tres tiempos (1, 2 y 3 horas respectivamente).

6.- Se procedió a realizar la hemólisis de la sangre de la siguiente manera: se midió 100 μ L de sangre y se completó a 1 mL con agua bidestilada, de

esta dilución se tomó 100uL y se completó hasta 5 mL con agua bidestilada y se reposó por 30 minutos.

7.- Seguidamente se realizó las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 650 nm, registrándose los resultados.

8.- Los resultados obtenidos se tabularon y compararon.

IV. RESULTADOS

4.1.- Resultados del estudio químico

Tabla 1. Solubilidad del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” a 25 °C.

SOLVENTE	OBSERVACION	RESULTADO
n-Hexano	++	Parcialmente soluble
Eter etílico	+++	Soluble
Cloroformo	++++	Muy soluble
Diclorometano	++++	Muy soluble
Acetato de etilo	++	Parcialmente soluble
Acetona	+++	Soluble
Butanol	+++	Soluble
Etanol	+	Poco soluble
Metanol	+	Poco soluble
Agua	-	Insoluble

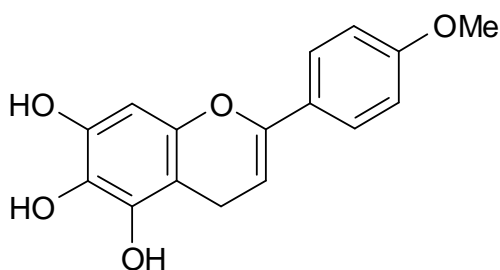
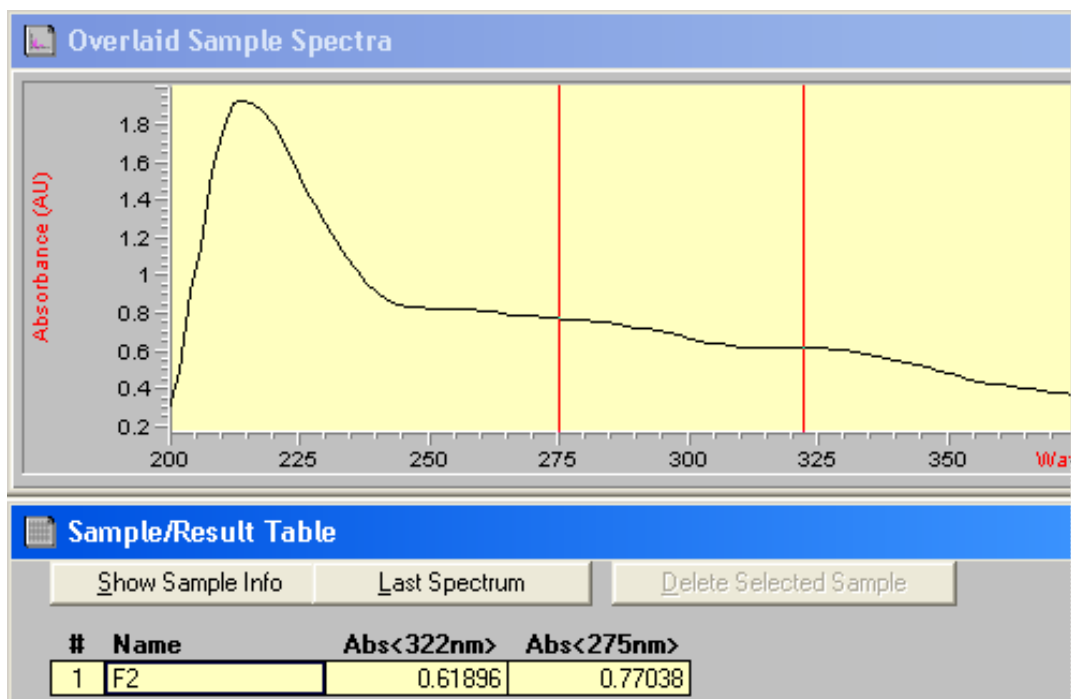
Leyenda: (-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Parcialmente soluble, (+++) Soluble, (++++) Muy soluble

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCION	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Glicosidos	Molish	++	Coloración violeta
Alcaloides	Dragendorf	++	Precipitado rojo
	Mayer	++	Precipitado blanco
	Popof	++	Precipitado amarillo
Taninos	Gelatina	++	Precipitado blanco
Aminoácidos libres	H ₂ O bromo	++	Precipitado amarillo
	Ninhidrina	--	
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración roja
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	++	Coloración verde
Saponinas	Ensayo de espuma	--	
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann- burchard	+++	Coloración verde azulada
Lactonas sesquiterpénicas	Bajlet	+	Coloración naranja
Antronas y naftoquinonas	Borntrager	+	Coloración rojo claro
Principios amargos y astringentes	Organoléptico	++	Sabor amargo y astringente

Leyenda:

- : No se evidencia presencia
- + : Presencia de trazas
- ++ : Presencia moderada
- +++ : Presencia abundante

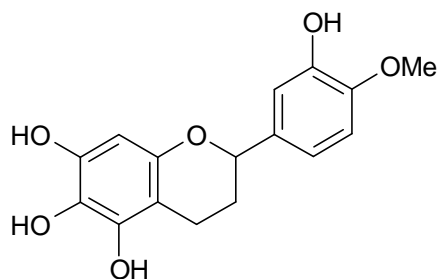
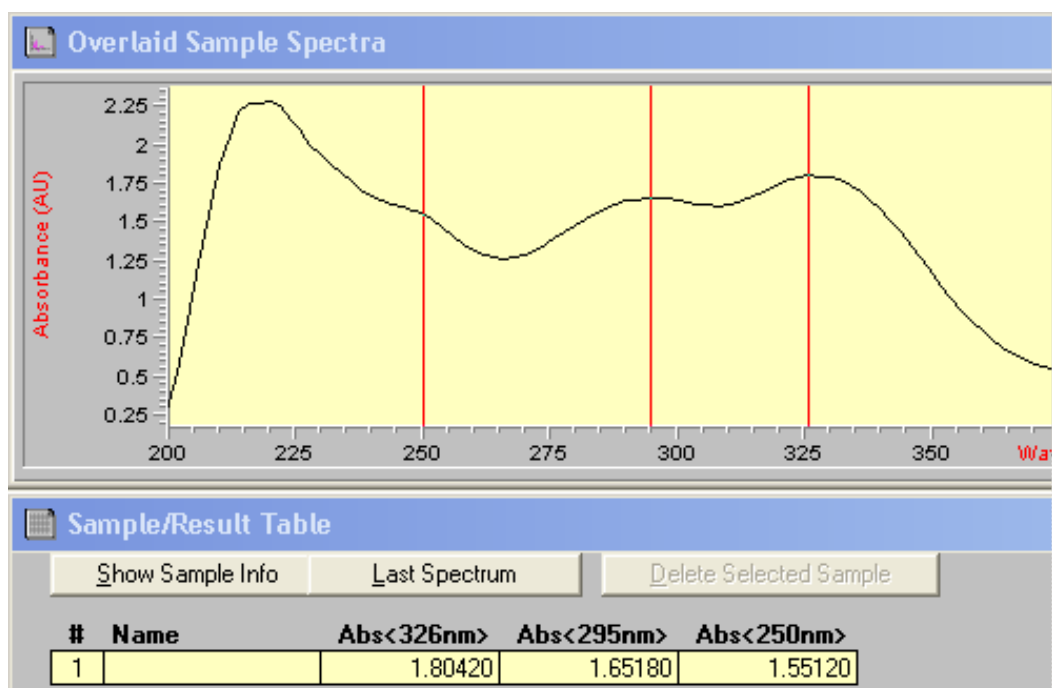


5,6,7-trihidroxi-4'-metoxi flavona

λ_{max} : 275, 322 nm

Figura 7. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F2 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

El espectrograma UV corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 225 y 322 nm, la molécula presenta 3 hidroxilos libres en las posiciones 5,6 y 7 del núcleo A y un grupo metoxi en la posición 4' del núcleo B.

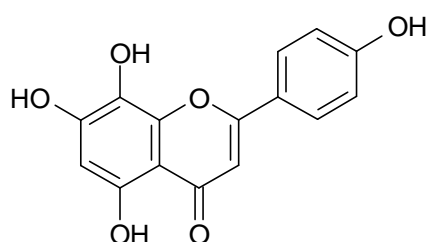
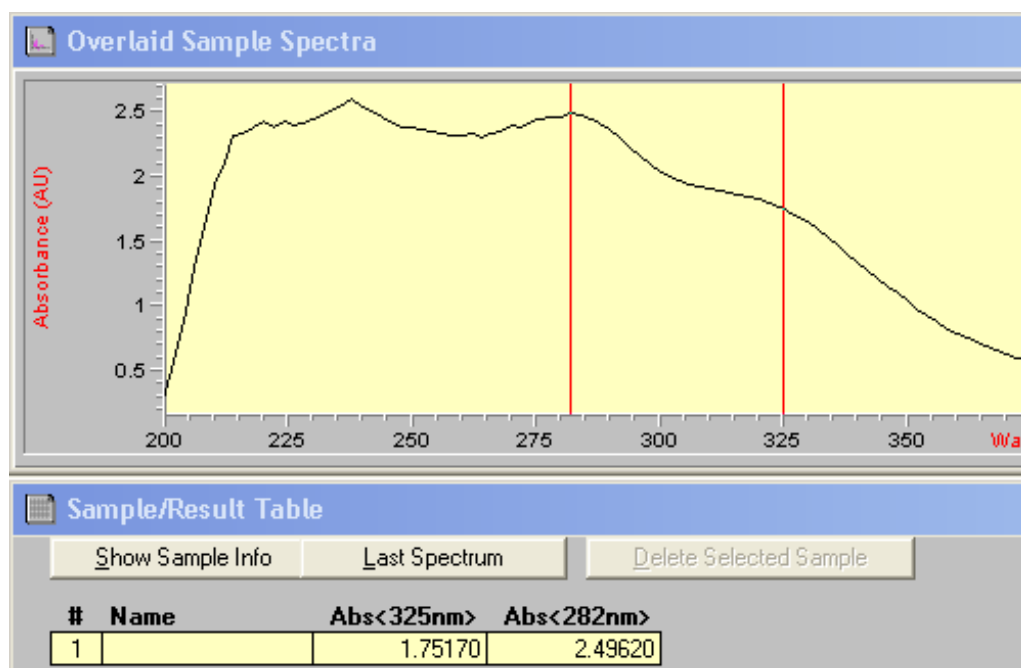


3',5,6,7- tetrahidroxi-4'-metoxi flavanona

$$\lambda_{\text{max}} : 250, 295, 326 \text{ nm}$$

Figura 8. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F3 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

El espectrograma UV corresponde al núcleo básico de una flavanona ya que presenta tres picos muy característicos a 250, 295 y 326 nm, la molécula presenta 3 hidroxilos libres en las posiciones 5,6 y 7 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 3' y un metoxi en la posición 4' del núcleo B.

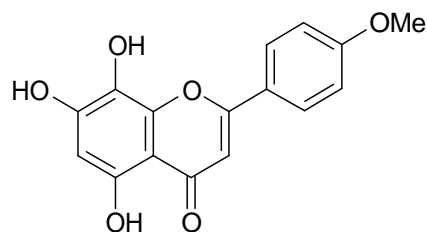
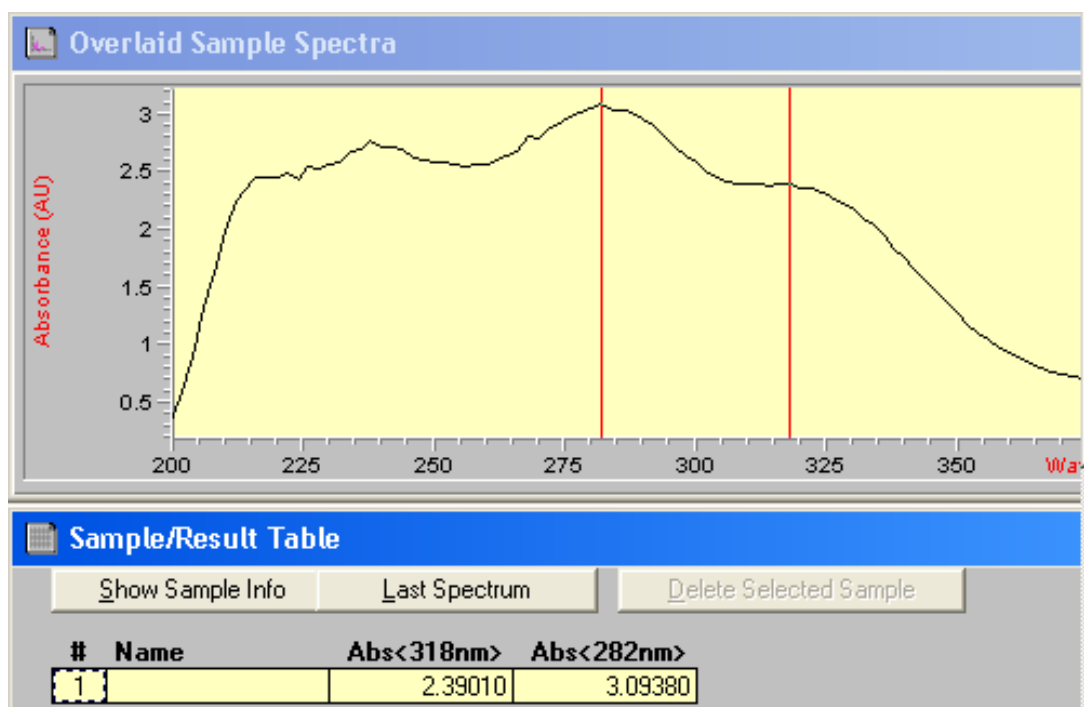


4',5,7,8-tetrahidroxi flavona

λ_{max} : 282, 325 nm

Figura 9. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F7 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

El espectrograma UV corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 282 y 325 nm, la molécula presenta 4 hidroxilos libres en las posiciones 5, 7 y 8 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 4' del núcleo B.



5,7,8-trihidroxi-4'-metoxi flavona

λ_{max} : 282, 318 nm

Figura 10. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F8 de Acetato de etilo extraído de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

El espectrograma UV corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 282 y 318 nm, la molécula presenta 3 hidroxilos libres en las posiciones 5, 7 y 8 del núcleo A y un grupo metoxi en la posición 4' del núcleo B.

4.2. Toxicidad aguda a dosis única de 2000 mg/kg de peso.

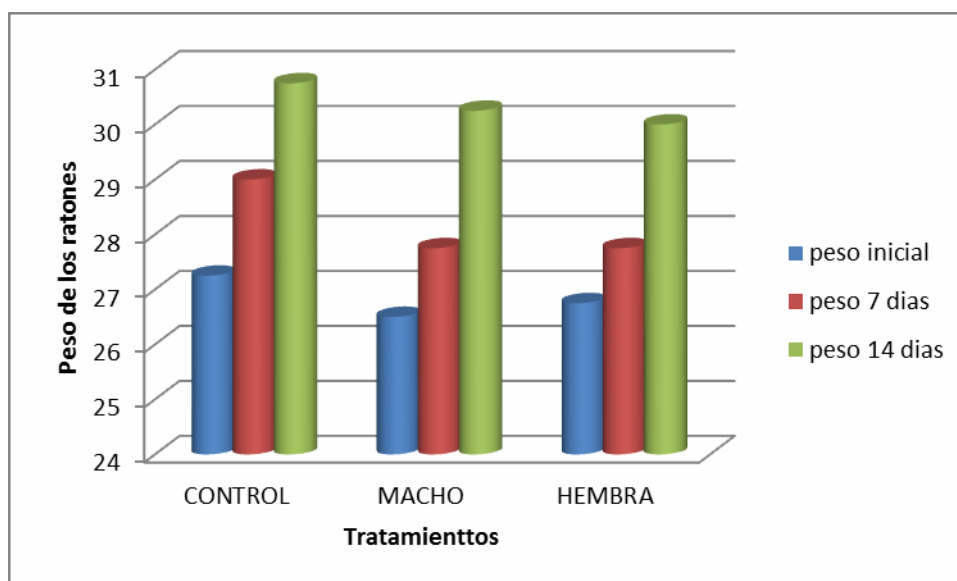


Gráfico 1. Peso promedio de ratones balb/c al evaluar la toxicidad aguda del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 3. Peso promedio de ratones balb/c al evaluar la toxicidad aguda del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamiento	Peso según Sexo					
	Machos	N	Promedio±DS	Hembras	N	Promedio±DS
Control	0 días	4	27.25 ± 0.96	0 días	4	27.25 ± 0.96
	7 días	4	29.00 ± 0.82	7 días	4	29.00 ± 0.82
	14 días	4	30.75 ± 0.50	14 días	4	30.75 ± 0.50
Extracto CCl ₄	0 días	4	26.50 ± 1.29	0 días	4	26.75 ± 0.96
hojas	7 días	4	27.75 ± 0.96	7 días	4	27.75 ± 0.96
<i>Chuquiraga lessing</i>	14 días	4	30.25 ± 1.50	14 días	4	30.00 ± 0.82

DS = Desviación estándar

Los resultados de demuestran la inocuidad del extracto porque el peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento de los ratones y la necropsia no arrojó ninguna alteración macroscópica de los órganos y tejidos examinados.

4.3. Resultados del estudio de la actividad antioxidante

4.3.1. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

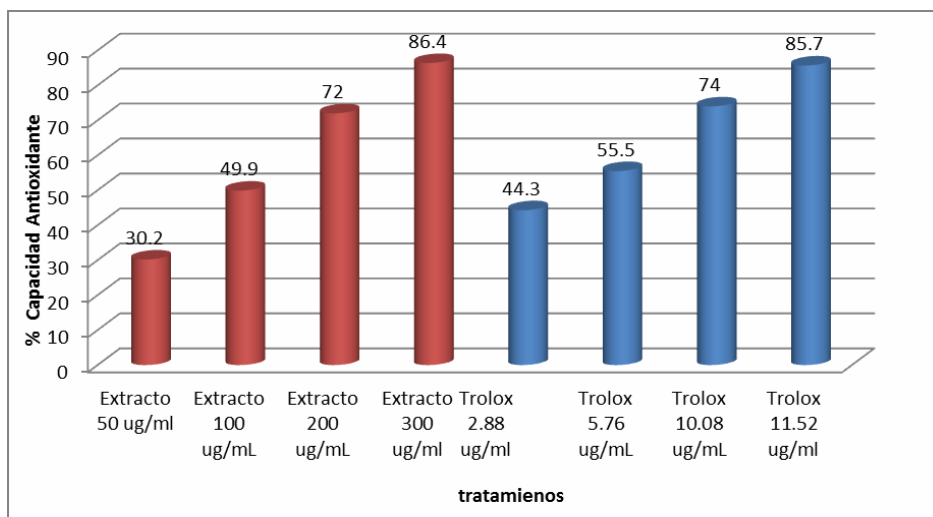


Gráfico 2. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

La actividad antioxidante del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, se midió por el método del DPPH a las concentraciones de 50ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL y 300 ug/mL encontrándose valores de 30.2, 49.9, 72.0 y 86.4 % respectivamente; comparados frente al Trolox, este presentó una capacidad antioxidante de 44.3, 51.5, 74.0 y 85.7%. De igual forma se ha calculado el IC₅₀ para el Trolox obteniéndose 3.4 ug/mL y el IC₅₀ para el extracto fue de 218.35 ug/mL, encontrándose un TEAC-DPPH de 0.016 ugTrolox/ug de extracto. De acuerdo a los resultados del estudio químico realizado (Tabla 1), son los flavonoides, triterpenos y esteroides los responsables de la actividad antioxidante^{5,6}.

4.3.2. Actividad antioxidante *in vivo* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”

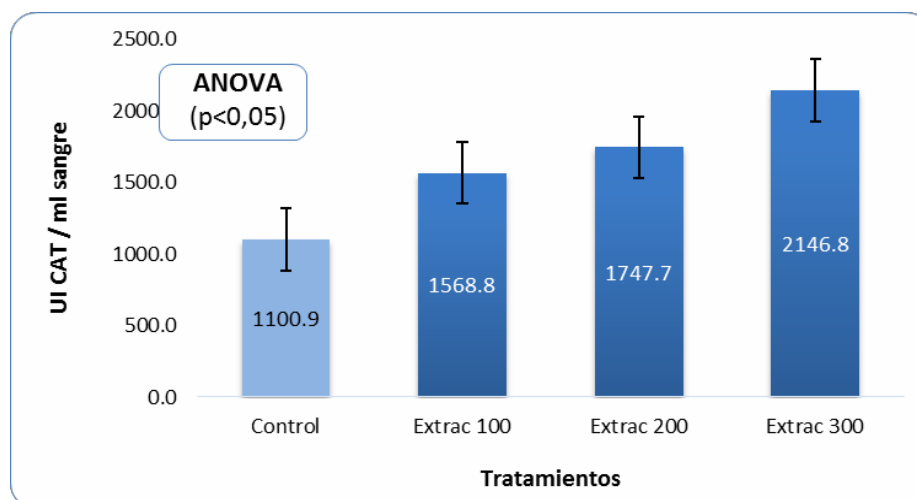


Gráfico 3. Promedio de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 4. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	1100,9 +/- 175,4
Extracto 100	7	1568,8 +/- 259,29
Extracto 200	7	1747,7 +/- 346,08*
Extracto 300	7	2146,7 +/- 378,12*
* p < 0,05 estadísticamente significativo promedio mayor al control Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett.		

Los resultados muestran que la actividad de la catalasa aumenta en forma dosis dependiente, encontrándose mayores actividades a la dosis de 200 y 300 mg/kg, siendo estas diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p < 0,05$).

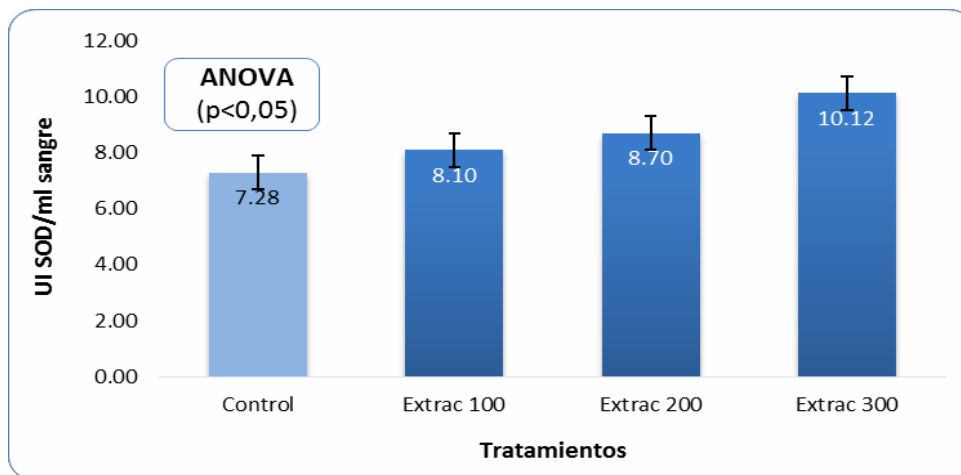


Gráfico 4. Promedio de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (UI SOD/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 5. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (UI SOD/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	7,28 +/- 0,38
Extracto 100	7	8,1 +/- 0,83
Extracto 200	7	8,7 +/- 0,33**
Extracto 300	7	10,12 +/- 1,85*

* p < 0,05 estadísticamente significativo promedio mayor al control
Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett.

Se observa que la actividad de la SOD aumenta con los tratamientos de 200 y 300 mg/kg, siendo estadísticamente significativos ($p < 0,05$) según el post test de Dunnett, no observándose este comportamiento para el extracto de 100 mg/kg respecto al control.

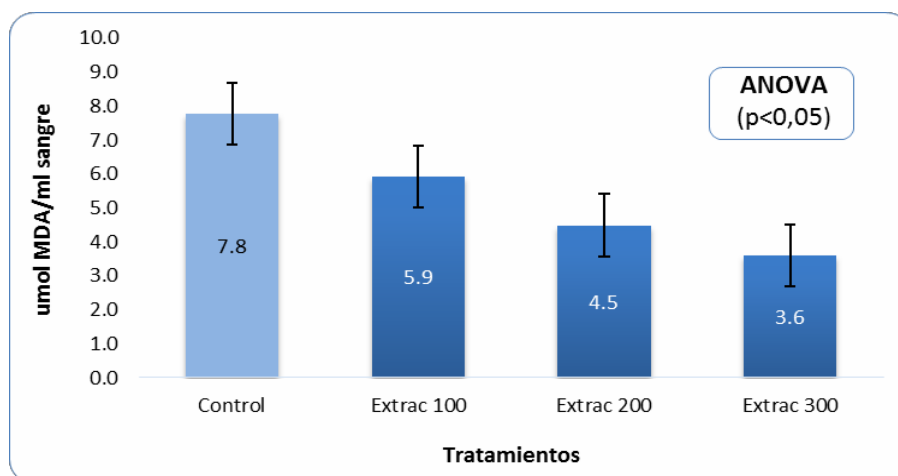


Gráfico 5. Promedio de niveles sanguíneos de Malondialdehído (umoles/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 6. ANOVA y significancia de niveles sanguíneos de Malondialdehído (umoles/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	7,7 +/- 0,46
Extracto 100	7	5,9 +/- 0,39*
Extracto 200	7	4,4 +/- 0,34*
Extracto 300	7	3,6 +/- 0,37*

* p < 0,05 estadísticamente significativo promedio menor al control Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett.

Se observa que la peroxidación lipídica es significativamente menor en los extractos respecto al control ($p < 0,05$), esto nos sugiere que el extracto clorofórmico contiene metabolitos secundarios capaces de proteger la peroxidación lipídica.

4.4. Resultados de la actividad antiinflamatoria

Tabla 7. Diámetro promedio de inflamación en mm. de la pata trasera al evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamientos	Tiempo en horas						
	Basal	0.5 h	1 h	2h	3h	5h	7h
Carragenina	4.21	6.50	7.50	8.40	9.10	9.50	9.10
Ibuprofeno	4.10	5.05	5.57	5.69	5.33	5.26	5.17
Prednisona	3.76	4.72	5.25	5.28	5.07	4.91	4.73
Extracto 100	4.41	6.60	7.40	7.70	8.00	7.40	7.00
Extracto 200	4.08	5.70	6.10	6.50	6.40	6.20	5.92
Extracto 300	4.07	5.20	5.70	5.90	5.70	5.60	5.40

La actividad antiinflamatoria según el modelo de Winter, evidencia la respuesta a la acción irritante de la carragenina en todos los grupos luego de una hora de ser administrada. Se observa también la tendencia antiinflamatoria en los mismos grupos después de las tres horas de tratamiento.

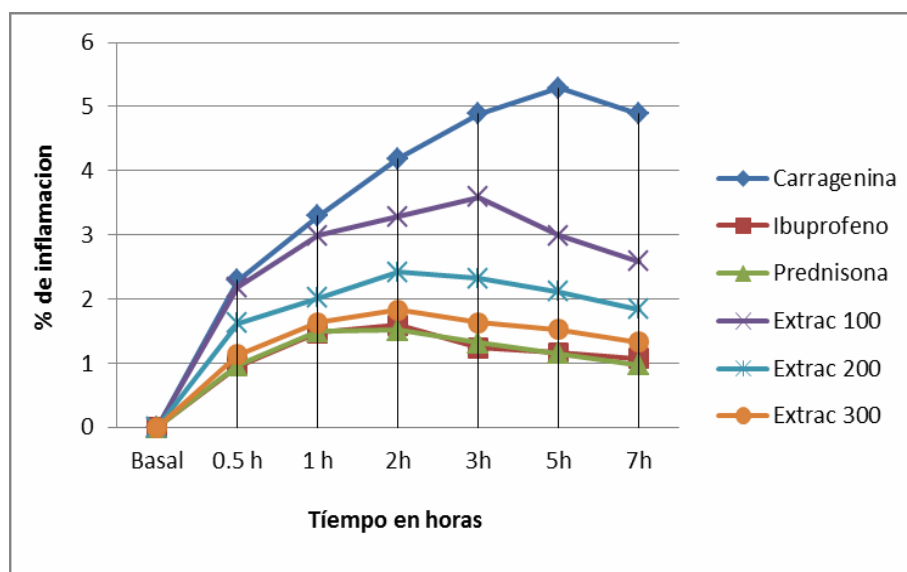


Gráfico 6. Curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación Vs tiempo de tratamiento con el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tabla 8. ANOVA y significancia de la curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación Vs tiempo de tratamiento con el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamiento	Tratamiento	Muestra	Diferencia	95% de intervalo de confianza para diferencia	
Ibuprofeno	Extracto 100	7	-1,6953*	-1.7439	-1.6468
	Extracto 200	7	-,8130*	-0.8616	-0.7644
	Extracto 300	7	-,2690*	-0.3176	-0.2204
Prednisona	Extracto 100	7	-1,6880*	-1.7366	-1.6394
	Extracto 200	7	-,8057*	-0.8542	-0.7571
	Extracto 300	7	-,2617*	-0.3102	-0.2131

*** p < 0,05 estadísticamente significativo**
Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Tukey.

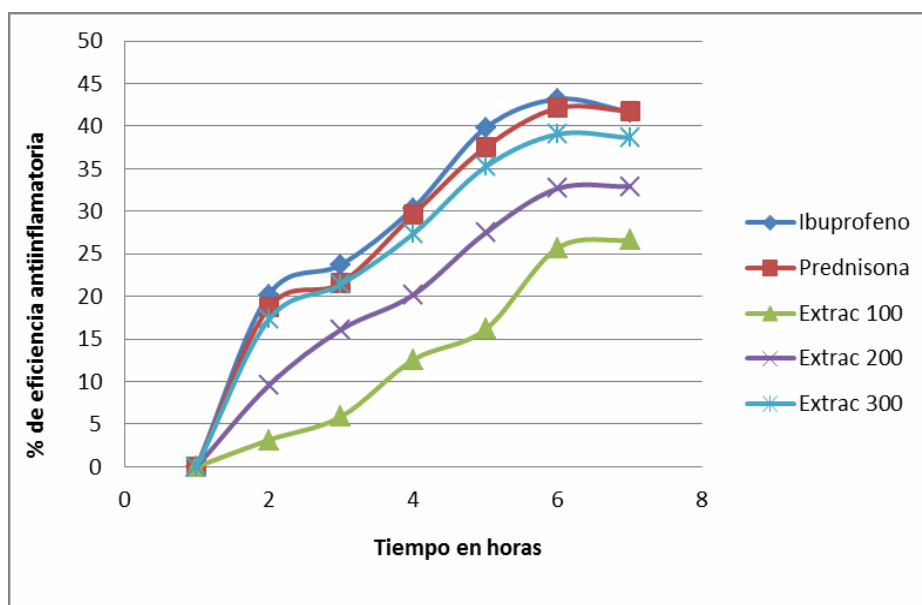


Gráfico 7. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

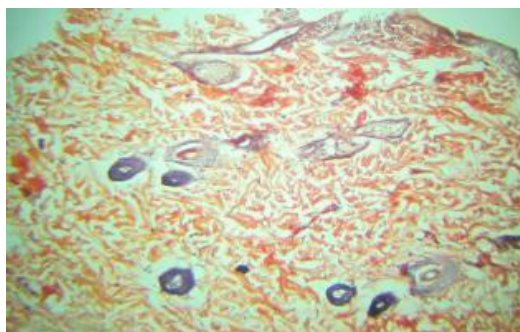
Tabla 9. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamientos	Tiempo en horas						
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h
Ibuprofeno	0	20.2	23.7	30.4	39.8	43.2	41.7
120 mg/kg							
Prednisona	0	18.7	21.6	29.6	37.5	42.1	41.8
1.2 mg/kg							
Extracto 100	0	3.2	5.9	12.6	16.2	25.7	26.6
mg/kg							
Extracto 200	0	9.6	16.1	20.2	27.5	32.7	32.9
mg/kg							
Extracto 300	0	17.3	21.4	27.4	35.2	39.1	38.6
mg/kg							

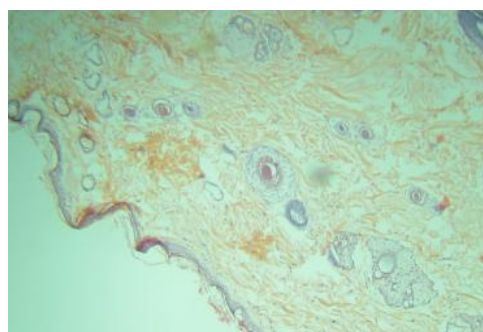
El extracto clorofórmico de la *Chuquiraga lessing* muestra Eficiencia Antiinflamatoria (%EAI), evidenciándose el mayor valor para los tratamientos de 200 y 300 mg/kg de peso a partir de las 3 horas de medición y el de 100 mg/kg de peso a partir de las 5 horas de medición; correspondiendo el porcentaje más alto al extracto de 300 mg/kg de peso(38.6%), seguido del extracto de 200 mg/kg de peso (32.9%) y el de 100 mg/kg de peso con (26.6%), para los estándares AINE (41.7%) y el AIE (41.8%) respectivamente.

En el tratamiento estadístico se utilizó el post test de Tukey y el análisis de varianza ($p<0,05$).

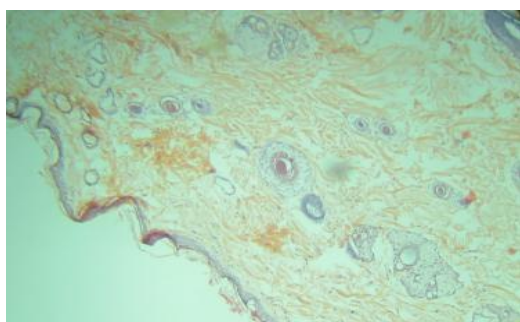
4.5. Resultados de la actividad antiinflamatoria en procesos crónicos



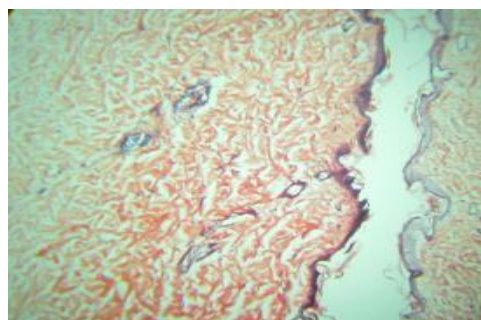
Control: Granuloma (+++) por carragenina



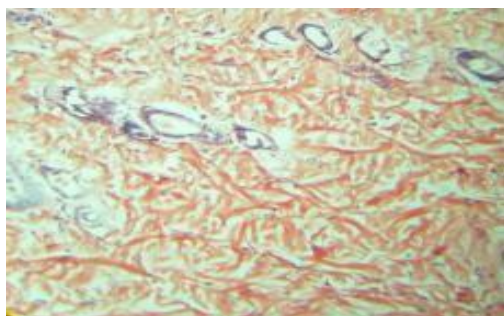
Estándar 1: Granuloma (+) por carragenina más Ibuprofeno 120mg/kg



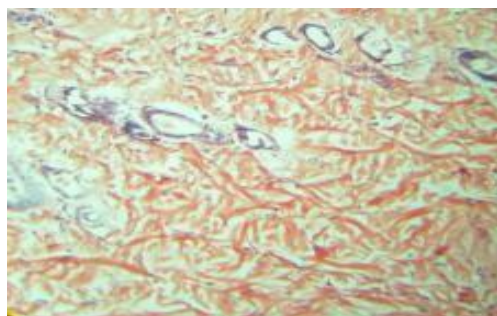
Estándar 2: Granuloma (+) por carragenina mas Prednisona 60 mg/kg



Extracto 100: Granuloma (+++) por carragenina mas extracto de 100 mg/kg



Extracto 200: Granuloma (++) por carragenina mas extracto de 200 mg/kg



Extracto 300: Granuloma (++) por carragenina mas extracto de 300 mg/kg

Figura 11. Estudio histopatológico de la piel de ratas al evaluar la actividad antiinflamatoria en procesos crónicos por inducción de granuloma con carragenina, ibuprofeno, prednisona y los extractos a 100, 200 y 300 mg/kg de peso (Aumento 40X).

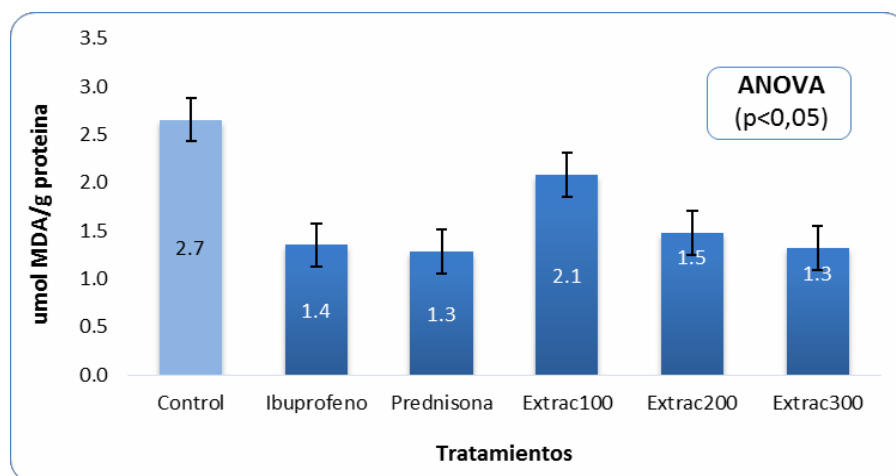


Gráfico 8. Promedio de los valores de Malondialdehído (MDA) en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 10. ANOVA y Dunnet del promedio de los valores de Malondialdehído (MDA) en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	2,6 +/- 0,45
Ibuprofeno	7	1,3 +/- 0,12*
Prednisona	7	1,2 +/- 0,39*
Extracto 100	7	2 +/- 0,42*
Extracto 200	7	1,4 +/- 0,3*
Extracto 300	7	1,3 +/- 0,17*

* p < 0,05 estadísticamente significativo

Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett.

Se observa que los estándares y los extractos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sí respecto al control (2.6 umol/g proteína, encontrándose una disminución significativa en los extractos de 100 mg/kg (2.0 umol/g proteína), 200 mg/kg (1.4 umol/g proteína), 300 mg/kg (1.3 umol/g proteína) y los estándares ibuprofeno (1.3 umol/g proteína) y prednisona (1.2 umol/g proteína).

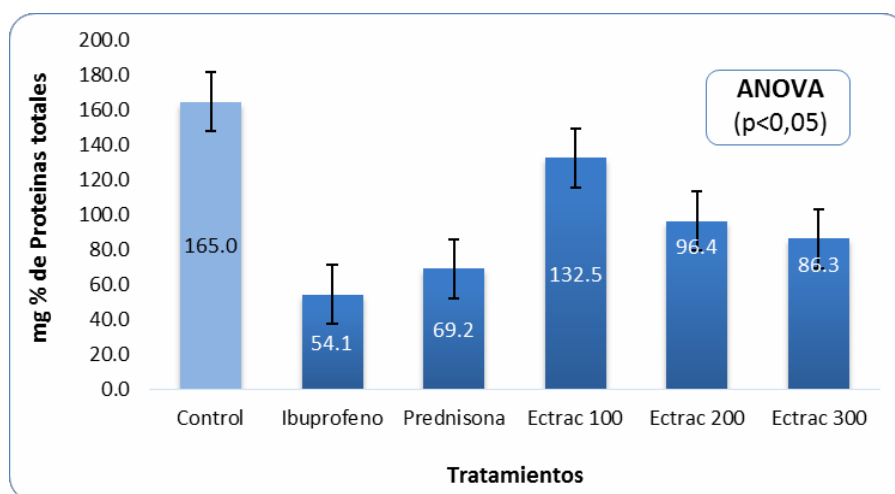


Gráfico 9. Promedio de los valores de proteínas totales en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 11. ANOVA y Dunnett del promedio de los valores de proteínas totales en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	165 +/- 12,56
Ibuprofeno	7	54,1 +/- 9,33*
Prednisona	7	69,1 +/- 13,6*
Extrac 100	7	132,5 +/- 11,86*
Extrac 200	7	96,3 +/- 10,3*
Extrac 300	7	86,3 +/- 13,31*

* p < 0,05 estadísticamente significativo

Se observa una disminución de los valores de proteínas totales en los extractos y los estándares respecto al control y es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), estos resultados nos sugieren que el extracto clorofórmico contiene metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias y que coadyuvan a reducir la migración de proteínas al tejido dañado.

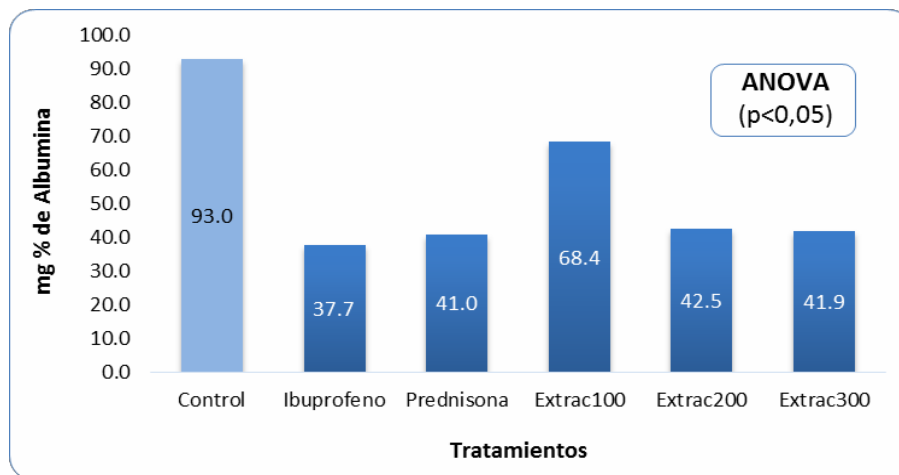


Gráfico 10. Promedio de los valores de albumina en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tabla 12. ANOVA y Dunnett del promedio de los valores de albumina en los diferentes tratamientos del fluido de la bolsa de aire producida para el estudio antiinflamatorio en procesos crónicos.

Tratamiento	Muestra	Promedio +/- desviación estándar
Control	7	92,9 +/- 4,75
Ibuprofeno	7	37,7 +/- 2,99*
Prednisona	7	41 +/- 4,26*
Extrac 100	7	68,3 +/- 1,93*
Extrac 200	7	42,5 +/- 2,78*
Extrac 300	7	41,9 +/- 3,02*

* p < 0,05 estadísticamente significativo

Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Dunnett.

Se ha encontrado una disminución significativa ($p < 0,05$) de la albumina en los grupos tratados con el extracto y los estándares respecto al control, observándose una concordancia con los valores de las proteínas totales.

4.6. Resultados de la actividad inmunomoduladora

Tabla 13. Captación de la tinta china y porcentaje de activación de la respuesta inmunomoduladora del extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.

Tratamientos	Tiempo					
	1ra hora	%	2da hora	%	3ra hora	%
Control	0.0708	0	0.0480	0	0.0404	0
Isoprinosine	0.0606	14.41	0.0365	23.96	0.0162	59.9
Prednisona	0.0676	4.52	0.0475	1.04	0.0378	6.43
Extracto 100	0.0638	9.89	0.0437	8.96	0.0293	27.47
Extracto 200	0.0619	12.57	0.0367	23.54	0.0209	48.27
Extracto 300	0.0543	23.31	0.0303	36.87	0.0215	46.78

* $p < 0,05$ estadísticamente diferencia significativa

Los resultados evidencian una mayor captación de la tinta china empleada como un agente cromoforo en los extractos de 200 mg/kg y 300 mg/kg en un 48.23 % y 46.78 % respectivamente en comparación al Isoprinosine con 59.9 % y una reducción significativa de la prednisona ($p < 0,05$).

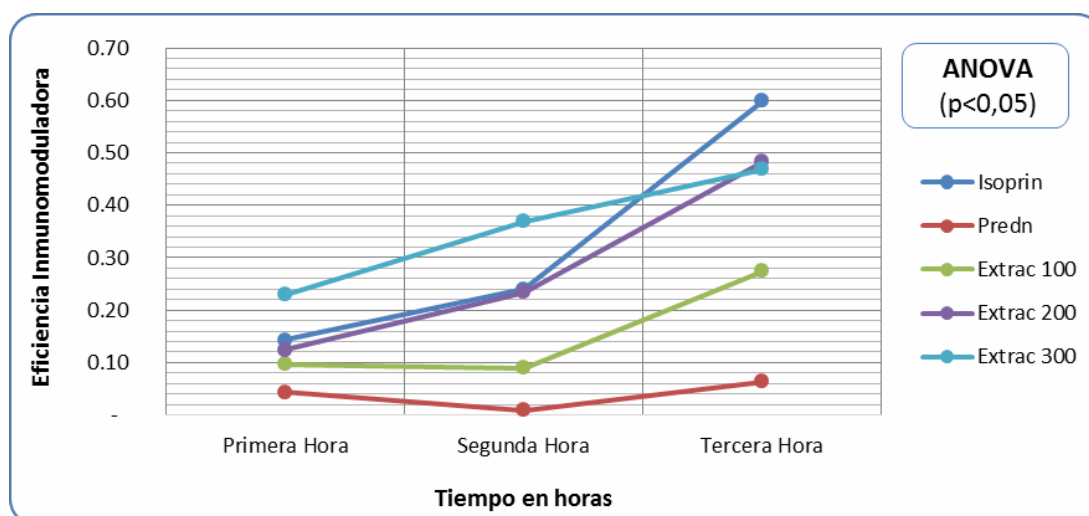


Gráfico 11. Actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” frente al Isoprinosine y prednisona.

Tabla 14. ANOVA y Scheffe de la eficiencia de la actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” frente al Isoprinosine y prednisona.

Tratamiento	Tratamiento	Muestra	Diferencia	95% de intervalo de confianza	
Isoprinosine	Extracto 100	7	,1737762*	0.1211	0.2264
	Extracto 200	7	0.047	-	0.0998
				0.0055	
	Extracto 300	7	-0.029	-	0.0241
				0.0812	
Prednisona	Extracto 100	7	-	-	-
			,1147838*	0.1675	0.0621
	Extracto 200	7	-	-	-
			,2414105*	0.2941	0.1887
	Extracto 300	7	-	-	-
			,3171327*	0.3698	0.2645
* p < 0,05 estadísticamente diferencia significativa					
Comparación frente a las respuestas control empleando un ANOVA con post test de Scheffe.					

Tabla 15. Acción sobre la formula leucocitaria del extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, vs los estándares.

Tratamiento (mg/kg)	Leu	Mono	Polim
Control (SF 5 ml/kg)	11240	78	22
Isoprinosine	12094	86	14
300mg/kg			
Prednisona 60 mg/kg	9902	55	45
Extracto 100 mg/kg	11464	75	26
Extracto 200 mg/kg	11698	81	19
Extracto 300 mg/kg	11540	80	19
* p > 0,05 estadísticamente no significativa			

Leu = Leucocitos, Mono = Mononucleares, Polim = Polimorfonucleares

Se observa que la formula leucocitaria muestra un aumento con los extractos de 200 mg/kg, 300 mg/kg y el Isoprinosine en comparación al control y una disminución significativa con la prednisona.

V. DISCUSIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se viene utilizando desde hace mucho tiempo. Durante largos períodos, los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales utilizadas para mitigar el dolor y curar enfermedades, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Es así que el uso medicinal de las plantas, la fitoterapia, nunca ha dejado de tener vigencia, muchas especies vegetales utilizadas por nuestros antepasados se siguen utilizando hoy en día.

5.1. Ensayos químicos

Los extractos contienen los principios activos no volátiles, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción.

En los **estudios de solubilidad**, se observa que el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* muestra una alta solubilidad en cloroformo, diclorometano y n-butanol, soluble en acetato de etilo, acetona y éter etílico, parcialmente soluble en n-hexano, poco soluble en etanol y metanol e insoluble en agua bidestilada, los resultados nos indican que los componentes químicos son de baja y mediana polaridad (Tabla 1).

Los ensayos de solubilidad son ensayos cualitativos o cuantitativos que permiten conocer la composición de la droga o planta, caracterizar principios activos y reconocer falsificaciones, se realizan con una finalidad cualitativa (identificar sustancias), cuantitativa (determinar su concentración) o ambas. Así mismo, la solubilidad de los flavonoides, depende de la forma en que se

encuentren, del número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo⁷⁸.

La **marcha fitoquímica** demostró la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, lactonas, antronas, naftoquinonas y principios amargos (Anexo 4), varios de estos metabolitos también fueron reportados por Torres (2000)⁶ y Casado et al, (2011)⁴, pero en extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa*. Los resultados muestran que son los flavonoides, los triterpenos y esteroides los más abundantes en este extracto y serían los responsables del efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador (Tabla 2).

A través de los **ensayos cromatográficos** se confirmó en el extracto clorofórmico la presencia de los flavonoides, observándose los cromatogramas con luz UV 366 nm y luz UV 254 nm (Anexo 5) y luego se procedió a su identificación química empleando FeCl₃ 5%, NaOH 0.1 M y reactivo de Shinoda (Anexo 6). Según Martínez A. (2005)⁷⁸, los flavonoides se reconocen experimentalmente mediante diferentes ensayos de coloración. En la reacción de Shinoda, los flavonoides con el núcleo benzopirona (ejm. flavonas, flavonoles, flavanonas) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado⁷¹.

La caracterización química de los flavonoides, se realizó por un fraccionamiento del extracto clorofórmico empleando acetato de etilo y obteniendo el sub-extracto respectivo y se verificó la presencia de los flavonoides por la reacción de Shinoda, obteniéndose un compuesto de color rojo que es un indicador positivo para los flavonoides, luego se procedió a su aislamiento y purificación mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa logrando aislar 12 fracciones de las cuales 4 fueron purificadas y

se caracterizó químicamente la estructura química de los flavonoides aislados por espectroscopia UV-Visible en metanol³, al analizar los espectros obtenidos de las fracciones F2, F3, F7 y F8 se observó que corresponde a flavonoides del grupo de las flavonas y flavanonas, sugiriéndose las estructuras de 4 flavonoides por comparación con espectros UV obtenidos en la literatura por Mabry et al. (1970)⁷².

Según Martínez M (2005)⁷⁸, los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento⁷².

La fracción F2 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 275 y 322 nm, y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry et al. (1970)⁷², la molécula tiene 3 hidroxilos libres en las posiciones 5, 6, 7 del núcleo A y un grupo metoxi en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona. (Figura 6).

La fracción F3 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavanona ya que presenta tres picos muy característicos a 250, 295 y 326 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry et al. (1970)⁷², la molécula tiene 3 hidroxilos libres en las posiciones 5, 6, 7 del núcleo A, y un grupo hidroxilo en la posición 3' y metoxi en la posición 4' del núcleo B, por

consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavanona: 3' 5, 6, 7-trihidroxi – 4'-metoxi flavanona (Figura 7). Según Blanco et al. (2008)⁷⁹ las flavanonas, derivan de las flavonas por desaparición del doble enlace del heterociclo central y el carbono 2 es asimétrico, por lo que presentan isomería óptica.

La fracción F7 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 282 y 325 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry et al. (1970)⁷², la molécula tiene 4 hidroxilos libres en las posiciones 5, 7, 8 del núcleo A, y un grupo hidroxilo en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 4' 5, 7, 8-tetrahidroxiflavona (Figura 8).

El espectrograma UV de la fracción F8 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 282 y 318 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Marby et al. (1970)⁷², la molécula tiene 3 hidroxilos libres en las posiciones 5, 7, 8 del núcleo A, y un grupo metoxi en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 5,7, 8-trihidroxi– 4'-metoxi flavona (Figura 9).

5.2. oxidadad aguda a dosis única

El extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* no produjo muertes ni signos tóxicos posteriores a la administración, y los resultados demostraron la inocuidad de la planta al no observarse signos ni síntomas de toxicidad. El peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento de la especie y la necropsia no arrojó ninguna alteración macroscópica de los órganos y tejidos examinados, lo que nos permite afirmar que la DL₅₀ se ubica por encima de 2000 mg/kg peso corporal, considerándose el extracto como No Clasificado (no tóxico), de acuerdo a las Clases de Toxicidad de la Comunidad Europea⁷⁴.

La variación de peso corporal de los ratones machos y hembras hasta los 14 días de exposición (Gráfico 1), (Tabla 3) no mostró diferencias con respecto al grupo control. Si bien se utilizó ratones hembras y machos de diferentes

pesos promedio, ello no alteró el protocolo de los ensayos experimentales pues cada grupo disponía de su control correspondiente. En conclusión se puede decir que el extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* no presenta mortalidad en el ensayo de toxicidad aguda, pero sí podría presentar algunas reacciones adversas atribuibles a dosis elevadas utilizadas en los ensayos experimentales.

5.3. Actividad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). El gráfico 2 representa la capacidad antioxidante expresada en porcentaje obtenida a las concentraciones de 50ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL y 300 ug/mL fueron de 30.2, 49.9, 72.0 y 86.4 %; comparados frente al Trolox, el cual presentó una capacidad antioxidante de 44.3, 51.5, 74.0 y 85.7% respectivamente. Si bien es cierto existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el método del DPPH *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros como el ABTS tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica⁷⁵.

De igual forma se ha calculado el IC₅₀ para el Trolox obteniéndose 3.4 ug/mL y el IC₅₀ para el extracto fue de 218.35 ug/mL, encontrándose un TEAC-DPPH de 0.016 ugTrolox/ug de extracto. De acuerdo a los resultados del estudio químico realizado (Tabla 1), son los flavonoides, triterpenos y esteroides los responsables de la actividad antioxidante^{5,6}.

La actividad de la catalasa aumenta en forma dosis dependiente, encontrándose mayores actividades a la dosis de 300 mg/kg (2146.7 UI CAT/mL sangre) y 200 mg/kg (1747.7 UI CAT/mL sangre), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), el extracto de 100 mg/kg genera un aumento en la actividad (1568.8 UI CAT/mL sangre) pero no es estadísticamente significativo respecto al control con 1100.9 UI

CAT/mL sangre (Tabla 4). Esto nos indica que extracto contiene metabolitos secundarios (Tabla 2) que participan en una respuesta más eficiente de la catalasa, que permite la disipación de los radicales libres generados durante el estrés (Gráfico 3).

La actividad de la SOD aumenta con los tratamientos de 300 mg/kg (10.12 UI SOD/mL sangre) y 200 mg/kg (8.7 UI SOD/mL sangre) siendo estos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) según el post test de Dunnett, no observándose este comportamiento para el extracto de 100 mg/kg (8.1 UI SOD/ml sangre) respecto al control (7.28 UI SOD/mL sangre), (Gráfico 4) (Tabla 5). La SOD es la enzima cuya actividad debe incrementarse en caso de un mayor consumo de oxígeno, como el caso del estrés inducido. La catalasa es la enzima que reduce el producto de la SOD, es decir, el peróxido de hidrógeno hasta agua y se espera que una mayor actividad de SOD debe ir acompañado de una mayor actividad de catalasa³⁷. En general las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa aumentan sus actividades a las concentraciones de 200 y 300 mg/kg de peso, esto nos sugiere que el extracto contiene metabolitos secundarios que coadyuvan o protegen a las enzimas antioxidantes, como por ejemplo los flavonoides^{3,5}. El efecto de los metabolitos encontrados en el extracto sobre las enzimas SOD y CAT pueden estar asociados a un incremento de la expresión o a un aumento en la actividad de estas enzimas, lo cual ha sido sugerido por otros autores^{76,77}.

En el gráfico 5 se muestran los valores de MDA en sangre tanto en el control como en los tratamientos, así como la significancia estadística encontrada al comprobar un mismo parámetro para los grupos estudiados (Tabla 6). Al contrario de lo que se esperaría, la peroxidación lipídica es significativamente menor en los extractos respecto al control. Así, el valor basal (Control) de MDA es de 7.8 umol/mL sangre y para los tratamientos alcanza valores de 5.9, 4.5 y 3.3 umol/mL de sangre respectivamente, lo que representa una disminución importante y, por lo tanto estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

De igual forma sugerimos que el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”, contiene metabolitos secundarios capaces de proteger la peroxidación lipídica, los que fueron identificados en el cuadro N° 2. Los autores indican que las propiedades quelantes de iones de hierro y protectoras⁷⁷ sobre el daño oxidativo de los lípidos que muestra el extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” empleando modelos *in vitro* pueden explicar su eficacia en disminuir las concentraciones de MDA *in vivo*⁷⁶.

Asimismo se sostiene que actualmente no existen suficientes estudios que expliquen los mecanismos moleculares por los cuáles ocurre la interacción entre los componentes de las plantas medicinales y los sistemas celulares que ayuden a comprender de mejor forma los efectos observados en la experimentación científica. Específicamente los fenómenos de expresión génica de enzimas antioxidantes se consideran procesos difícilmente dilucidables por la enorme variación genética entre individuos y los factores ambientales que intervienen⁸⁰, no obstante en este estudio se pudo observar diferentes respuestas, un incremento en las actividades de la CAT y SOD y una disminución de la lipoperoxidación (MDA).

5.4. Actividad antiinflamatoria

El resultado de la actividad antiinflamatoria, se expresa como el promedio de los volúmenes, medidos en milímetros (mm) (Tabla 7), de la pata posterior derecha de los individuos (n = 7) de cada grupo evaluado, respecto al tiempo en que se realizó la medición, lo que se aprecia en la curva tiempo-efecto (Gráfico 6). Sin embargo existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las respuestas de todos los tratamientos realizados, en cada tiempo de medición (Tabla 8). En el tratamiento estadístico se utilizó el post test de Tukey y el análisis de varianza ($p < 0,05$). Asimismo, se determinó el porcentaje de la Eficiencia Antiinflamatoria (%EAI), evidenciándose el mayor valor para los tratamientos de 200 y 300 mg/kg de peso a partir de las 3 horas de medición y el de 100 mg/kg de peso a partir de las 5 horas de medición; correspondiendo el porcentaje más alto al extracto de 300 mg/kg de peso (38.6%), seguido del extracto de 200 mg/kg de peso (32.9%) y el de

100 mg/kg de peso con (26.6%), para los estándares AINE (41.7%) y el AIE (41.8%) respectivamente (Tabla 9).

La evaluación de los ensayos farmacológicos, evidencia la respuesta a la acción irritante de la carragenina en todos los grupos luego de una hora de ser aplicada. Se observa además la tendencia antiinflamatoria en los mismos grupos después de 3 horas de aplicar los tratamientos, tal como puede apreciarse en el gráfico 6. Se verifica el efecto antiinflamatorio en todos los grupos tratados (AINE, AIE, Extracto 100, 200 y 300 mg/kg) y en todos los tiempos de medición, la respuesta difiere del grupo control (sin tratamiento), en el cual se manifiesta un estado inflamatorio progresivo, que inicia un ligero descenso a partir de la sexta hora (Gráfico 7). En el tratamiento estadístico se utilizó el post test de Tukey y el análisis de varianza ($p < 0,05$).

En estudios previos realizados por Casado et al. (2011)⁴ y Torres, (2004)⁶ se presenta la vía oral como la de mayor actividad anti-inflamatoria para *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” y la vía tópica como la menor actividad¹⁹, lo cual fue tomado en cuenta para nuestra evaluación en la que utilizamos solamente la vía oral. Se sabe que los antiinflamatorios esteroideos son los de mayor potencia^{10,11} en nuestro estudio el AIE, ha obtenido un porcentaje de inhibición más alto (41.8 %) respecto a los extractos (26.6, 32.9 y 38.6 % respectivamente), y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) han tenido un comportamiento similar (41.7 %) lo cual es concordante con lo reportado por Casado et al (2011)⁴ y Sotelo (1998)²⁰ en trabajos experimentales anteriores. Es probable que los modos y mecanismos de acción, la farmacocinética y farmacodinamia, así como el método empleado tengan influencia directa sobre las respuestas obtenidas.

En el estudio de la actividad antiinflamatoria en procesos crónicos se observa el grupo control con abundante formación de granuloma que es una respuesta típica de los procesos inflamatorios crónicos, constituidos esencialmente por macrófagos, incremento de fibroblastos, haces de colágeno, histocitos, capilares dilatados con hiperemia (Figura 10). Asimismo se observa fenómenos alterativos, como necrosis, células de carácter

inflamatorio, como polinucleares, linfocitos, plasmocitos y extravasación de fluido.

Por otra parte, el proceso inflamatorio producido por carragenina inicia con la inducción y liberación de histamina, serotonina y quininas de fase temprana, así como prostaglandinas, proteasas y lisosomas en fases tardías¹¹. El granuloma es una respuesta típica de los procesos inflamatorios crónicos, en los que la reacción aguda no es capaz de eliminar el agente flogístico y durante la formación del granuloma, ocurre un incremento de fibroblastos, síntesis de colágeno y mucopolisacáridos para aislar dentro del tejido afectado un cuerpo extraño¹⁰. En los grupos tratados con Ibuprofeno y prednisona, se observa poca formación de granuloma, con pocos leucocitos, macrófagos, tejido conjuntivo laxo y enfisema. También se observa poca dilatación vascular, encontrándose una buena protección contra el proceso inflamatorio crónico, siendo mejor en el grupo tratado con la prednisona respecto al ibuprofeno. Respecto al efecto de los extractos se puede observar que en los extractos de 200 mg/kg y 300 mg/kg hay poca formación de granuloma, macrófagos, histiocitos, asimismo hay regeneración del tejido y poca dilatación vascular; no observándose esos efectos en el extracto de 100 mg/kg, donde se observa mayor granuloma, macrófagos poca regeneración del tejido y dilatación vascular (Figura 10). Por lo tanto disminuyen la permeabilidad vascular local inducida por mediadores de la anafilaxia y la migración leucocitaria⁸¹ hacia el área de inflamación con actividad similar al Ibuprofeno. El extracto clorofórmico mostró una significativa actividad antiinflamatoria en procesos crónicos, que refleja su eficacia en inhibir la fase proliferativa de la inflamación y refuerza la hipótesis de su acción antiinflamatoria a través de diferentes mecanismos.

De igual forma los autores sostienen⁸, que es necesario determinar los niveles de proteínas y la lipoperoxidación, por lo que se determinó la concentración de proteínas totales, albumina y la concentración de MDA. Los niveles de Malondialdehido (MDA) en los estándares y los extractos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 10) entre sí respecto al control (2.6 $\mu\text{mol/g}$ proteína), observándose una disminución significativa en

los extractos de 100 mg/kg (2.0 umol/g proteína), 200 mg/kg (1.4 umol/g proteína), 300 mg/kg (1.3 umol/g proteína) y los estándares ibuprofeno (1.3 umol/g proteína) y prednisona (1.2 umol/g proteína), (Gráfico 8), es decir en los grupos tratados con el extracto hay una disminución en la peroxidación lipídica, en el tejido en reparación con respecto al grupo control, lo cual sugiere que el extracto y los estándares muestran propiedades antioxidantes dado el hecho de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes, encargadas de la conversión de ERO en moléculas menos perjudiciales y proteger a los lípidos del daño oxidativo. Los investigadores sugieren^{31,32,76} que el efecto de los extractos que promueven la disminución de los valores de MDA, pueden deberse a un aumento en los niveles de antioxidantes (SOD y CAT) y una disminución de la oxidación de los lípidos.

En relación a las proteínas se observa una disminución de los niveles de proteínas totales en los extractos y los estándares respecto al control esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), los autores sostienen^{10,82} que los cambios de fase aguda y crónica de la inflamación se dividen en cambios en las concentraciones de proteínas en el tejido dañado y los antiinflamatorios ejercen el efecto opuesto (Gráfico 9) (Tabla 11). Estos resultados nos sugieren que el extracto clorofórmico contiene metabolitos secundarios (flavonoides, triterpenos y esteroides) con propiedades antiinflamatorias y que coadyuvan a reducir la migración de las proteínas al tejido inflamado.

También los resultados muestran una disminución significativa ($p < 0,05$) de la albúmina (Tabla 12) en los grupos tratados con el extracto y los estándares respecto al control (Gráfico 10), siendo las albuminas la fracción más importante de las proteínas totales, los resultados muestran una concordancia con los valores encontrados (Gráfico 9). Los autores sostienen⁸³ que las proteínas de fase aguda modulan la respuesta inflamatoria, neutralizando agentes extraños, disminuyendo la extensión del daño tisular y participando en la regeneración tisular. Sin embargo, si estos cambios metabólicos se mantienen por períodos prolongados, traen consecuencias perjudiciales para el individuo³⁹. Existen evidencias de que ocurren una variedad de cambios en el metabolismo lipídico durante la

infección y la inflamación¹². Asimismo, es ampliamente reconocido que las citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e interleuquina 6 (IL-6) que median la respuesta inmune del huésped durante los procesos inflamatorios e infecciosos. Finalmente los resultados obtenidos sugieren que el extracto contiene metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias.

5.5. Actividad inmunomoduladora

Se evaluó la actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” sobre la respuesta inmune por el método de Estimulación Retículo Endotelial citado por Arroyo et al. (2004)⁹, para comprobar la presencia o ausencia de actividad inmunomoduladora se administró el extracto a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso y compararlos con los estándares farmacológicos de inhibición como la prednisona a 60 mg/kg la cual inhibe significativamente la respuesta inmune al reducir la presencia de los linfocitos T¹² y otro de estimulación el Isoprinosine 300 mg/kg, el cual es un inmunoestimulante que interviene a la vez en el componente celular y el componente humoral de la respuesta inmunitaria, estimula la actividad de los macrófagos de los linfocitos B y T y potencializa la acción de algunas linfoquinas.

En la tabla 13 se observa que el extracto a 200 mg/kg y 300 mg/kg aumentan la respuesta inmune en un 48.23% y 46.78% respectivamente en comparación al estándar Isoprinosine 59.9% ($p < 0,05$), dicho efecto se corrobora al evidenciarse una mayor captación de la tinta china usada como sustancia cromófora de contraste y determinado mediante espectrofotometría visible a una longitud de onda de 650 nm en muestras de sangre hemolizadas³. Asimismo se observa que la prednisona reduce la respuesta inmune (6.43%) en forma significativa ($p < 0,05$), al disminuir el número de linfocitos circulantes, resultados similares fueron reportados por Bonilla (2001)³.

La actividad inmunomoduladora del extracto se hace más importante a partir de las dos horas, donde el extracto de 300 mg/kg muestra un efecto

constante en comparación al extracto de 200 mg/kg, pero ambos con valores cercanos al estándar isoprinosine (Gráfico 11) y estadísticamente significativos con $p < 0,05$ (Tabla 14). Varios diterpenos y triterpenos son conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras, los flavonoides otro grupo de polifenoles naturales también exhiben propiedades inmunomoduladoras así como los alcaloides¹⁴; estos metabolitos se han encontrado en el estudio fitoquímico del extracto (Tabla 2) y serían los responsables del efecto inmunomodulador de este recurso vegetal.

Los resultados del recuento de la formula leucocitaria (Tabla 15) muestran un aumento con los extractos de 200 y 300 mg/kg y el isoprinosine en comparación al control y una disminución significativa con la prednisona. Si bien hay diferencias en el recuento de la formula leucocitaria, todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente a través del análisis de varianza (ANOVA) para determinar si la actividad inmunomoduladora sobre los linfocitos fue significativa, el análisis estadístico nos indica que esta no es significativa ($p > 0,05$).

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo 69.15g de extracto y se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas, antronas, principios amargos y astringentes.
2. Se caracterizó la estructura química de los siguientes flavonoides: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona, 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona; 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona.
3. La DL_{50} estaría sobre 2000 mg/kg peso corporal, considerándose el extracto como No Clasificado (no tóxico), de acuerdo a las Clases de Toxicidad de la Comunidad Europea.
4. La actividad antioxidante del extracto *in vitro* fue de 86.4% (300 ug/mL) e *in vivo* aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (2146.8 UI/ml sangre), SOD (10.12 UI/ml sangre) y reducir la lipoperoxidación como MDA (3.6 umol/ml sangre).
5. El extracto presentó la mayor actividad antiinflamatoria a la dosis de 300 mg/kg (39.1 %) y 200 mg/kg de peso (32.7%); y una eficiencia Inmunomoduladora de 48.23% (200 mg/kg) y de 46.78% (300 mg/kg) respectivamente ($p < 0,05$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios químicos que permitan separar y caracterizar la estructura química de los otros metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.
2. Realizar ensayos para evaluar la actividad biológica de los alcaloides, triterpenos, esteroides ya son los metabolitos secundarios más abundantes hallados en el presente estudio.
3. Realizar ensayos para evaluar su actividad antiprostática, ya este recurso natural es usado en la medicina tradicional para aliviar estas dolencias.
4. Realizar otros estudios sobre la actividad Inmunomoduladora empleando otros modelos experimentales.
5. Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional, ya que esta especie es considerada como un recurso natural muy promisorio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. Estado del arte del sector de plantas medicinales en Perú. Ministerio de la Producción. 2008.
2. Montealegre P, Francis L. Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms en un modelo de inflamación intestinal agudo en ratas. Rev Cubana Plan Med. 2012; 17(4): 343-359.
3. Bonilla P. Flavonoides de *Ephedra Americana* (pinco-pinco), acción biológica sobre el sistema inmunológico (IgE). Tesis de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 2001.
4. Casado R, Landa A, Calvo J, Garcia-Mina J, Marston A, Hostettmann K, Calvo M. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Biol. Pharm. 2011; 49 (6): 620-6.
5. Chávez H, Molina A, Ramos R, Ferreyra C, Revatta L. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios bioactivos de *Chuquiraga spinosa* "huamanpinta". I Congreso Internacional y III Congreso Nacional de investigación científica tecnológica. Libro de resúmenes. Ica-Perú. 2011.
6. Torres M. Actividad antiinflamatoria prostática del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa lessing* "qarisirwi" en *Canis familiares*. Tesis de Químico Farmacéutico. Ayacucho-Perú. 2004.
7. Kapoor M, Clarkson A, Sutherland B, et al. The role of antioxidants in models of inflammation: Emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. Inflammopharmacology. 2005; 12(5-6): 505-519.
8. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de Investigación Farmacológica. Facultad Medicina Humana. UNMSM. 2012.
9. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Facultad Medicina Humana. UNMSM. 2004.
10. Gómez H, González K, Medina D. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Santiago, Chile. 2011; 10(3): 182-217.

11. Katzung B, Masters S, Trevor A. Farmacología básica y clínica. 11va edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. China. 2010.
12. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman y Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 9ma. Edición. México. 1996.
13. Newman D, Cragg G, Snader K. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. J Nat Prod. 2003; 66: 1022 -1037.
14. Pichardo N, Teo A. Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica (*P. alliacea* L y *S. domingensis* Willd). Tesis de Química Bióloga. Facultad de ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala. 2010.
15. Sánchez C, Gupta M, Santana A. Actividad Inmunomoduladora de plantas. Revista de Fitoterapia. 2002; 2(2): 151-163.
16. Fabri R, Nogueira M, Dutra L, Bouzada M, Scio E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de especies da família Asteraceae. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. 2011; 13 (2):183-189.
17. León F, Cabieses F. Efecto Antiinflamatorio de la *Uncaria tomentosa* "uña de gato". Odontología Sanmarquina. 2000; 1(6): 66-68.
18. Contreras C. Tamizaje fitoquímico y evaluación de los extractos bencénico, alcohólico y acuoso de las hojas de *Chuquiraga spinosa* Lessing "jarisirwi". Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga-Ayacucho. 2003.
19. Arenas, J. Marcha Fitoquímica y Efecto Diurético de *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae) en *Cavia porcellus* (cobayos). Universidad Nacional San Agustín. Arequipa-Perú. 2000.
20. Sotelo, C. Atividade antiinflamatória da *Chuquiraga spinosa* subsp. "huamanpinta" em ratos e camundongos. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Teses de Mestre em Ciências. 1998.
21. Amir Jhorfran Z, Azadbacht H, Karimi M. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 72: 167-172.

22. Ebringerova A, Kardosova A, Hromadkova Z, Hribalova V. Mitogenic and co-mitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*. 2003; 74: 52-61.
23. Choi E, Koo S, Hwang J. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 91(1): 1-6.
24. Mungantiwar A, Nair A, Shideau A, Dikshit V, Saraf M, Thakur V, Sainis K. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 65(2):125-131.
25. Mostacero J. *Taxonomía de Fanerógamas Peruanas*. Editorial CONCYTEC. La Libertad-Perú. 1993.
26. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*. 2011; 90(1): 9-17.
27. Cui X, Kim J, Zhao X, Chen B, Lee B, Pyo H. Antioxidative and acute anti-inflammatory effects of *Campsis grandiflora* flower. *J Ethnopharmacol*. 2006; 103(2): 223-8.
28. Naik E, Dixit V. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*. 2011; 208(3): 417-20.
29. Crotan R, Kumar V, Robbins S. *Patología estructural y funcional*. Volumen I. 4ª edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. pp. 39-67. 1990.
30. Lansky E, Newman R. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109: 177-206.
31. Burke A, Smyth E, FitzGerald G. Agentes analgésicos-antipiréticos; Farmacoterapia de la gota. En: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds.), Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11va edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, México. pp. 671-696. 2007.
32. Leyva H, Quezada R. Respuesta inflamatoria. *Patología general e inmunología*. Editorial Trillas, México. pp. 149-184. 2008.

33. Roome T, Dar A, Ali S, Naqvi S, Iqbal C. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2008; 118:514-521.
34. Kim D, Chun O, Kim Y, Moon H, Lee C. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008; 54: 6509-6515.
35. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Farmacología*. 5ta edición. Editorial Elsevier. España. pp. 217-260. 2004.
36. Valscesia-Mayor. Farmacología. 2005.
37. Suárez S. Antioxidantes en recursos fitoterapéuticos. Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina Humana. UNMSM – Lima. 2006.
38. Finkel T, Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000; 408: 239-247.
39. Maldonado O, Jiménez E, Bernabé M, Ceballos G, Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Revista Médica Universidad Veracruzana. Julio-Diciembre. 2010.
40. Colak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. Journal of Medical Biochemistry. 2008; 27(1): 1-16.
41. Venereo G, Justo R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cubana Med Militar. 2002; 311: 26-133.
42. Howes R. The free radical fantasy: A panoply of paradoxes. Annals of the New York Academy of Science. 2006; 1067: 22-26.
43. Dalle-Donne I, Scaloni A, Guistarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella, G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. Mass Spectrom Rev. 2005; 24: 55-99.
44. Devasagayam T, Tilak J, Bloor K, Sane K, Ghaskadbi S, Lele R. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J. Assoc. Physicians India. 2004; 52: 794-804.
45. Zamora JD. Antioxidants: Micronutrients fighting for health. Rev Chil Nutr. 2007; 34: 1-11.

46. Camacho A, Mendoza J. La naturaleza efímera de los radicales libres. Química y Bioquímica de los radicales libres. In: Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Pachuca Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. pp. 27-76. 2009.
47. Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804:1645-1651.
48. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng X. A role for the mitochondrial deacetylase SIRT3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:14447-14452.
49. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*. 2010; 464:121-125.
50. Ozden O, Park SH, Kim HS, Jiang H, Coleman MC, Spitz DR, Gius D. Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY)*. 2011; 3:102-107.
51. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, et al. SIRT3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*. 2010; 40:893-904.
52. Adelman D, Casale T, Corren J. Alergia e Inmunología. Madrid-España. pp.544. 2005.
53. Abbas A, Litchman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 4ta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2002.
54. Roit I, Delves P, Martin S, Barton D. Inmunología fundamentos. 11va Edición. Editorial Panamericana. 2008.
55. Stites D, Terr A. Inmunología básica y clínica. 10ª edición. México: Manual Moderno. pp. 1055. 2001.
56. Chaplin D. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117: 430-435.
57. Rojas W. Inmunología. 12ª Edición. Colombia-Medellín. Corporación para investigaciones biológicas. pp: 720. 2001.


58. Ibáñez E. Curso de Inmunología. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España. 1999.
59. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Therry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:621-67.
60. George A, Stark J, Chan C. Understanding specificity and sensitivity of T-cell recognition. *Trends in Immunology*. 2005; 26: 653-658.
61. Schepetkin I, Quinn M. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. 2006; 6: 317-333.
62. Rininger J, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 68: 503-510.
63. Castillo C. Actividad moduladora del sistema del complemento de cinco plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de infecciones protozoarias intracelulares. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2003.
64. Álvarez E. Actividad inmunomoduladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos. Guatemala. 2006.
65. Wilasrusmee O, Kittur S, Shah G. Immunostimulatory effect of *Silybum marianum* (milk thistle) extract. *Med Sci Monit*. 2002; 8(11): 439-443.
66. Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M, Bodinet C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine*. 2006; 13: 688-694.
67. Bermúdez A, Oliveira M, Velasquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*. 2005.30 (8).
68. Abreu O, Cuellar A. Estrategias en la selección de plantas a investigar. Instituto de Farmacia y alimentos. Universidad de La Habana. Cuba. 2008.

69. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. Editor Mohabir P. Gupta Ph. D. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo - Subprograma de Química fina Farmacéutica. pág. 87-93. 1996.
70. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana - Cuba: Editorial Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. pp. 23-33. 2000.
71. Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontifica Universidad Católica del Perú. 1994.
72. Mabry T, Markhan K, Thomas M. The systematic identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp: 16-147. 1970.
73. Murillo E, Mendez J. Fitoquímica. Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios. Universidad del Tolima. Ibagué. 2007.
74. OECD. Organization for economic co-operation and development. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class. Test N° 423. pp: 1- 14. 2001.
75. Ramos E, Castañeda B, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev. Acad. Perú Salud. 2008. 15(1).
76. Sánchez J, Faure R, Martínez G, Vega E, Fernández O. Propiedades antioxidantes de *rhizophora mangle* (l.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. Rev Cubana Salud Animal. 2009. 31(3): 170-175.
77. Suárez S, Oré R, Arnao I, Rojas L, Trabucco J. Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. An Fac med. 2009. 70(3):181-5.
78. Martínez A. Los flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2005.

79. Blanco B, Saborío A, Garro G. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor) Tecnología en Marcha. 2008. 21(2): 17-24
80. Vargas N. Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de *Geranium shiedeanum*. Tesis de Maestra en ciencias biomédicas y de la salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 2012.
81. Matiz G, Franco L, Rincón J. Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L. (Swartz). Rev. Univ. Ind. Santander. 2011. 43 (3).
82. González L, Molina J. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. Rev Colombiana de Reumatología. 2010.17 (1): 35-47.
83. Garcés F, Rivas A, Paiva C, Sifontes S, Stekman H, Villasmil J, Gerardi A. Marcadores de inflamación y disfunción endotelial en niños con infección bacteriana. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría. 2010. 73 (4).

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Clasificación taxonómica de la especie



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 08-USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Huamanpinta), recibida de **Emilio Germán REMÍREZ ROCA**; ha sido estudiada y clasificada como: ***Chuquiraga lessing***; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE


GENERO: Chuquiraga

ESPECIE: *Chuquiraga lessing*

Nombre vulgar: "Huamanpinta".
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 15 de enero de 2014



Dña. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs. (511) 471-0117, 470-4471
470-7918, 619-7000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

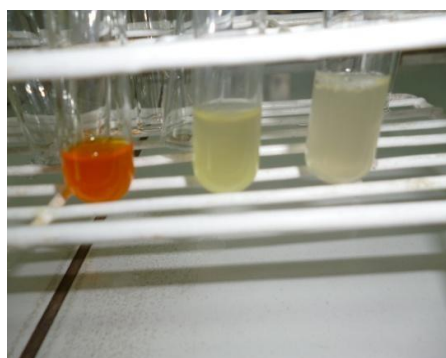
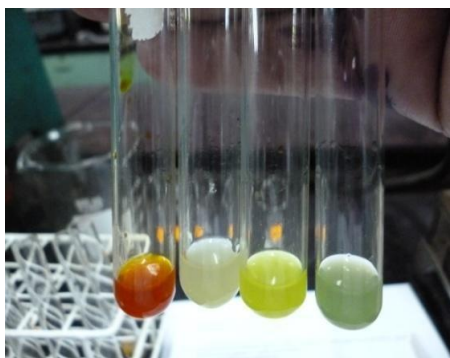
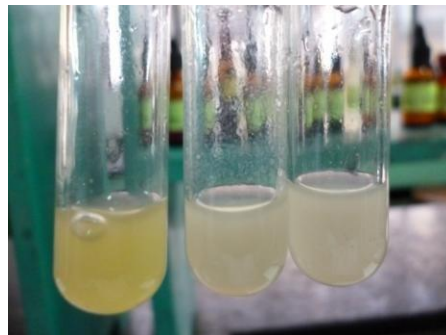
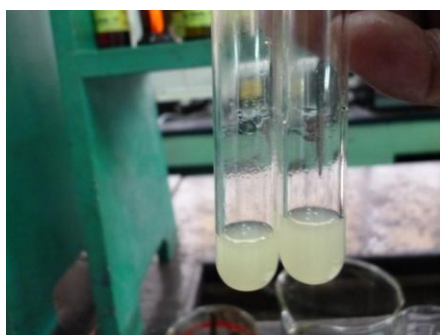
ANEXO 2: Recoleccion secado de la muestra de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” distrito de Vinchos-Huamanga-Ayacucho a 3800 msnm



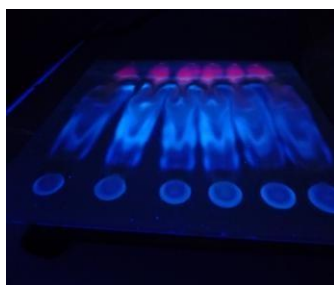
ANEXO 3: Obtencion del extracto cloroformico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.



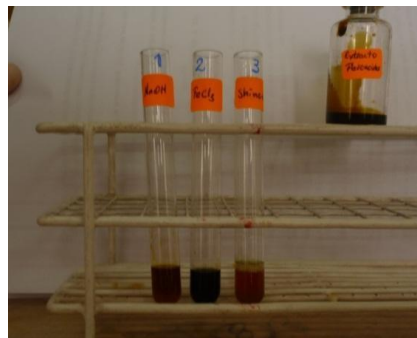
ANEXO 4: Fotografía de las reacciones fitoquímicas de los metabolitos secundarios identificados en el extracto cloroformico de las hojas de Chuquiraga lessing “huamanpinta”. Lima 2013.



ANEXO 5: Fotografía de los ensayos cromatograficos de los metabolitos secundarios identificados en el extracto cloroformico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”. Lima 2013.



ANEXO 6: Obtencion e identificacion química de los flavonoides en el extracto cloroformico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta”.



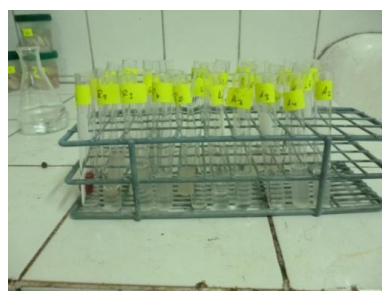
ANEXO 7: Determinación de la actividad inmunomoduladora del extracto cloroformico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta.”



ANEXO 8: Evaluacion de la actividad antiinflamatoria según Winter del extracto cloroformico de las hojas de *Chuqiraga lessing* “huamanpinta.



ANEXO 9: Evaluacion de la actividad antiinflamatoria en procesos cronicos según Sedwik del extracto cloroformico de las hojas de *Chuqiraga lessing* “huamanpinta.



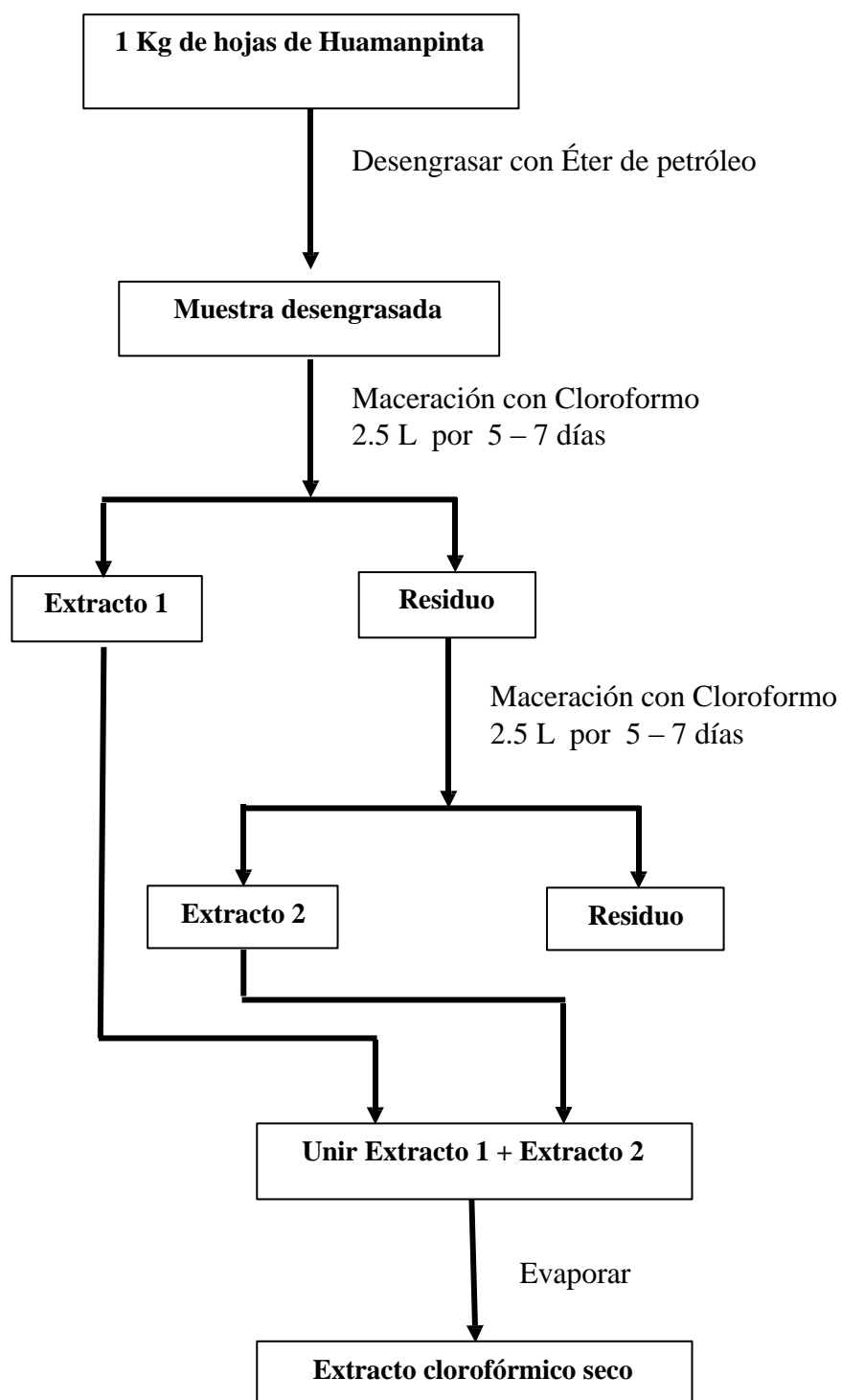
ANEXO 10: Determinación de la toxicidad a dosis fija de 2000 mg/kg del extracto cloroformico de las hojas de *Chuqiraga lessing* “huamanpinta.



ANEXO 11: Determinación de proteínas totales y albumina



ANEXO 12: Procedimiento para la Obtención del Extracto Clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* Lessing “huamanpinta”



ANEXO 13: Ensayos Químicos y Biológicos en el Extracto Clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* Lessing “huamanpinta”.

